

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CINTHYA COVESSI THOM DE SOUZA

NÍVEIS DO ALÉRGENO DA POEIRA DA SOJA (GLY M 1) NO AR AMBIENTE
DA CIDADE DE MARINGÁ-PR

CURITIBA

2020

CINTHYA COVESSI THOM DE SOUZA

NÍVEIS DO ALÉRGENO DA POEIRA DA SOJA (GLY M 1) NO AR AMBIENTE
DA CIDADE DE MARINGÁ-PR

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário
Filho

CURITIBA

2020

S729 Souza, Cinthya Covessi Thom de
Níveis do alérgeno da poeira da soja (Gly m 1) no ar
ambiente da cidade de Maringá-PR [recurso eletrônico] /
Cinthya Covessi Thom de Souza. – Curitiba, 2020.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em
Saúde da Criança e do Adolescente. Setor de Ciências
da Saúde. Universidade Federal do Paraná.
Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto do Rosário Filho

1. Alérgenos. 2. Amostras de ar. 3. Soja. 4. Ensaio de
imunoabsorção enzimática. 5. Ar exterior. I. Rosário Filho,
Nelson Augusto. II. Programa de Pós-Graduação em Saúde
da Criança e do Adolescente. Setor de Ciências da Saúde.
Universidade Federal do Paraná. III. Título.

NLM QW 910

FICHA CATALOGráfICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA
JORDÃO CRB 9/991



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE - 40001016013P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CINTHYA COVESSI THOM DE SOUZA** intitulada: **NÍVEIS DO ALÉRGENO DA POEIRA DE SOJA (GLY m 1) NO AR AMBIENTE DA CIDADE DE MARINGÁ-PR**, sob orientação do Prof. Dr. NELSON AUGUSTO ROSÁRIO FILHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 18 de Dezembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

21/12/2020 15:34:41,0

NELSON AUGUSTO ROSÁRIO FILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

21/12/2020 07:26:55,0

CARLOS ANTONIO RIEDI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

22/12/2020 12:24:03,0

ERNESTO AKIO TAKETOMI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA -
UFU-MG)

Assinatura Eletrônica

21/12/2020 08:51:30,0

DEBORA CARLA CHONG E SILVA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/12/2020 09:16:22,0

RICARDO HENRIQUE MORETON GODOI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico

Aos meus pais, Elizabeth e Vandy, e minha irmã Fernanda por tudo que representam e fazem por mim.

Ao meu esposo, Rodrigo, meu grande amor e parceiro da vida.

Aos meus amados filhos Maria Eduarda, Tiago e Pedro por iluminarem meus dias. Por eles luto diariamente para ser uma pessoa melhor e para poder torná-los pessoas boas para o mundo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e mestre, Prof. Dr Nelson Augusto Rosário Filho, pela dedicação e incontáveis ensinamentos o que me propiciou trilhar com segurança os caminhos da pesquisa durante todos estes anos.

Ao Prof. Dr Carlos Antônio Riedi por sua generosidade não somente em participar desta banca, mas em todos os momentos da minha formação como aluna da graduação, residência e pós-graduação. Seu conhecimento e visão crítica sempre são muito agregadores.

Aos Prof. Dr Ricardo Moreton Godoi pelo fornecimento dos materiais para realização das coletas deste estudo. Por sua visão científica e disponibilidade durante todos os momentos de desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr Ernesto Taketomi por abrir as portas do Laboratório de Alergia viabilizando a realização desta pesquisa. À toda sua equipe do laboratório, em particular à Dra Juliana Silva Miranda que compartilhou seu conhecimento, paciência e empenho em auxiliar na concretização desta pesquisa.

Ao Programa de Saúde da Criança e do Adolescente e seus professores e funcionários manifesto meu apreço pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Universidade Federal do Paraná pela qual nutro gratidão e amor por todos estes anos. Nesta instituição fiz minha graduação, residência, especialização, mestrado e agora, doutorado. Agradeço a todos os professores e funcionários que de alguma forma fizeram parte da minha formação, aos colegas e amigos que fiz e levarei para vida toda.

Ao meu querido esposo, Rodrigo, por seu amor e apoio incondicional, por sua dedicação a mim, aos nossos filhos e por sua ajuda essencial nas análises deste trabalho.

Aos meus pais e irmã sempre presentes em todos os momentos, pelo amor, dedicação, esforços e pela confiança que depositam em mim.

À Deus, minha maior e eterna gratidão: pelo dom da vida, pela família, pela profissão e tudo que me proporcionou e me proporciona diariamente.

RESUMO

O conhecimento da aerobiologia local é fundamental para o alergista. Os aeroalérgenos são capazes de sensibilizar e levar ao desenvolvimento de doenças respiratórias alérgicas. Em uma mesma região, com o passar do tempo, podem ocorrer mudanças na distribuição destes aeroalérgenos da atmosfera, conforme as mudanças climáticas, poluição e atividades agroindustriais. O objetivo deste estudo foi verificar a presença e concentração do alérgeno principal da poeira da casca da soja (Gly m 1) na atmosfera da cidade de Maringá-PR e possíveis associações com fatores climáticos. A escolha da soja deve-se a alta prevalência desta cultura na região, bem como a presença de uma grande cooperativa de beneficiamento localizada na região urbana da cidade. Para tal, foram realizadas coletas de material atmosférico, por meio de um amostrador de material total, durante o período de Março de 2017 à Março de 2018. As coletas foram realizadas durante 24 ou 48 horas e foram distribuídas no decorrer do período, totalizando 70 amostras, das quais 10 foram excluídas por problemas técnicos durante a coleta. As amostras foram avaliadas pelo método ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) para Gly m 1. Todas as amostras apresentaram níveis detectáveis de Gly m 1. Não houve diferenças estatísticas entre as concentrações dos filtros de 24 e 48 horas. A mediana de concentração de Gly m 1 foi de 4,89 ng/m³. Os valores encontrados variaram de 0,66 ng/m³ a 1826,1 ng/m³. Das 60 amostras analisadas, 23% delas apresentaram valores superiores a 90 ng/m³, sendo os meses de junho/2017 e março/2018 com concentrações mais elevadas. Houve correlação positiva das concentrações de Gly m 1 com os dados tratados em raiz cúbica com as temperaturas máxima, média e mínima, umidade relativa, vento e insolação. As correlações foram maiores com a exclusão dos valores extremos da (outliers). Por fim, os dados evidenciam exposições constantes da população ao alérgeno do Gly m 1, por vezes em níveis elevados possivelmente capazes de gerar sensibilização e sintomas.

Palavras-chave: alérgenos, soja, amostras de ar, ar exterior, ELISA

ABSTRACT

The knowledge of local aerobiology is essential for the allergist. Aeroallergens are capable of sensitizing and leading to the development of allergic respiratory diseases. In the same region, over time, changes in the distribution of these aeroallergens in the atmosphere may occur, depending on climate change, pollution and agro-industrial activities. The aim of this study was to verify the presence and concentration of the main allergen from soybean bark dust (Gly m 1) in the atmosphere of the city of Maringá-PR and possible associations with climatic factors. The choice of soybeans is due to the high prevalence of this crop in the region, as well as the presence of a large processing cooperative located in the urban region of the city. For this, samples of atmospheric material were carried out, through a total material sampler, during the period from March 2017 to March 2018. The collections were carried out during 24 or 48 hours and were distributed throughout the period, totaling 70 samples, 10 of which were excluded due to technical problems during collection. The samples were evaluated by the ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) method for Gly m 1. All samples showed detectable levels of Gly m 1. There were no statistical differences between the concentrations of the filters at 24 and 48 hours. The median concentration of Gly m 1 was 4.89 ng/m³. The values found ranged from 0.66 ng/m³ to 1826.1 ng/m³. Of the 60 samples analyzed, 23% of them had values above 90 ng/m³, with the months of June/2017 and March/2018 having the highest concentrations. There was a positive correlation between the concentrations of Gly m 1 and the data treated in cubic roots with the maximum, average and minimum temperatures, relative humidity, wind and sunshine. The correlations were greater with the exclusion of the extreme values of (outliers). Finally, the data show constant exposures of the population to the Gly m 1 allergen, sometimes at high levels possibly capable of generating sensitization and symptoms.

Key words: allergens, soybean, air samples, outdoor air, ELISA.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1 – ALÉRGENOS DA SOJA	20
FIGURA 1 – FILTRO E AMOSTRADOR.....	26
FIGURA 2 – BOMBA DE VÁCUO (A) E MEDIDOR DE VOLUME (B).....	26
FIGURA 3 - LOCAL DE AMOSTRAGEM.....	27
FIGURA 4 – MAPA DA REGIÃO COM O PONTO DE COLETA E LOCAL DA COOPERATIVA.....	28
FIGURA 5- ORGANOGRAMA DOS PROTOCOLOS DESENVOLVIDOS E AVALIADOS.....	31
FIGURA 6 – FASES DA EXTRAÇÃO DOS FILTROS	32
FIGURA 7- DETALHAMENTO DO ELISA PARA GLY M 1.....	35
FIGURA 8 – ETAPA FINAL DA TÉCNICA DE ELISA	35
FIGURA 9- PLACA DE ELISA PRONTA PARA LEITURA POR ESPECTOFOTOMETRIA.....	36
FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DA COLETA E ANÁLISE DOS FILTROS.....	37
FIGURA 11 – DIREÇÃO DOS VENTOS DE ACORDO COM A LOCALIZAÇÃO DA COOPERATIVA DE SOJA E O LOCAL DE COLETA.....	43
FIGURA 12 – ROSA DOS VENTOS DE ACORDO COM O PREDOMÍNIO DE DIREÇÃO E INTENSIDADE DOS VENTOS REFERENTES AOS DIAS DE COLETA.....	43
FIGURA 13- DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE GLY M 1 EM BOX PLOT, EVIDENCIANDO OS OUTLIERS.....	45
FIGURA 14 - CONCENTRAÇÕES DE GLY M 1 EM ESCALA LOGARÍTIMICA (LOG NA BASE 10) NAS 60 AMOSTRAS.....	45
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO DOS PERÍODOS DE SEMEADURA, COLHEITA E VAZIO SANITÁRIO ENTRE 29/03/2017 A 27/03/2018.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DADOS DOS FILTROS COLETADOS.....	40
TABELA 2 - DIREÇÃO DO VENTO E MENSAGEM SINÓTICA.....	42
TABELA 3 – DADOS CLIMÁTICOS E CONCENTRAÇÃO DE GLY M 1 DOS FILTROS AMOSTRADOS (N=60).....	46
TABELA 4 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (R) E DETERMINAÇÃO (R ²) ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE GLY M 1 (NG/M ³) E FATORES CLIMÁTICOS.....	48
TABELA 5 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (R) E DETERMINAÇÃO (R ²) ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE GLY M 1 (LOG10 E RAIZ CÚBICA) E FATORES CLIMÁTICOS.....	48
TABELA 6- COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (R) E DETERMINAÇÃO (R ²) ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE GLY M 1 (SEM OUTLIERS) E FATORES CLIMÁTICOS.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

CO₂ – dióxido de carbono ou gás carbônico.

D.pteronyssinus: *Dermatophagoides pteronyssinus*, espécie de ácaro da poeira domiciliar.

ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay*

Gly m 1 – Subgrupo de alérgenos do tipo 1 derivado da casca do grão de soja.

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

IgE – Classe de imunoglobulina do tipo E

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

kDa – Unidade de medida de massa

ng/mL – Unidade de medida de concentração do alérgeno (nanograma) por mL da solução de eluição.

ng/m³ – Unidade de medida de concentração do alérgeno (nanograma) por unidade de ar (metros cúbicos).

NH₄HCO₃ – bicarbonato de amônio

nm – Nanômetro. Medida utilizada para especificar comprimento de onda de luz.

Phl p 5 – Subgrupo de alérgenos do tipo 5 derivado da gramínea *Phleum pratense*.

RAST – *radioallergosorbent test*

rpm – rotações por minuto

UR – umidade relativa do ar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 HIPÓTESES	15
1.2 OBJETIVOS	15
1.3 JUSTIFICATIVA	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 OS AEROALÉRGENOS E O ALERGISTA	17
2.2 A SOJA NO BRASIL E PARANÁ	19
2.3 ALÉRGENOS DA SOJA	21
2.4 AEROALÉRGENOS DA SOJA E SINTOMAS RESPIRATÓRIOS	23
3 MATERIAIS E MÉTODO	27
3.1 TIPO DE ESTUDO	27
3.2 AMOSTRAS	27
3.3 LOCAL E DATAS DE AMOSTRAGEM	29
3.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS FILTROS	30
3.4.1 DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO	30
3.4.2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL DOS FILTROS	34
3.4.3 ANÁLISE POR ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>) PARA Gly m 135	
3.4.3.1 DESCRIÇÃO DO ELISA PARA Gly m 1	35
3.6 DADOS METEOROLÓGICOS	40
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
3.8 FOMENTOS E INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES	40
4 RESULTADOS	42
4.1 CARACTERÍSTICAS DOS FILTROS AMOSTRADOS	42
4.2 ANÁLISE DOS DADOS METEOROLÓGICOS	43
4.2.1 TEMPERATURAS MÁXIMA, MÍNIMA E MÉDIA COMPENSADA E UMIDADE RELATIVA DO AR (UR)	43
4.2.2 PRECIPITAÇÃO E INSOLAÇÃO	43
4.2.3 VENTO	44
4.3 CONCENTRAÇÕES DE GLY M 1	46
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÕES	60
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICES	77
PRODUÇÃO ACADÊMICA	84

1 INTRODUÇÃO

Evidências sugerem que as doenças respiratórias alérgicas estão mais prevalentes, mais graves e precoces, apesar dos tratamentos empregados serem cada vez melhores. Isto possivelmente está relacionado às mudanças do estilo de vida da população, bem como às mudanças climáticas e poluição ambiental (D'AMATO et al, 2016, ARANDA et al, 2018; CECHI et al, 2020).

A exposição alergênica é fundamental para que ocorra a sensibilização e posterior desencadeamento de sintomas. Os níveis necessários para sensibilizar os indivíduos predispostos nem sempre são bem estabelecidos e podem variar dependendo da população e da fonte alergênica do local (BUTERS, 2014). O surgimento da alergia molecular permitiu identificar com sensibilidade e especificidade o perfil de sensibilização dos indivíduos. Da mesma forma, abriu perspectivas para a compreensão dos alérgenos de cada local, suas concentrações e potenciais exposições da população (VIEIRA, 2014; VALENTA et al, 2018).

Neste contexto, o alérgeno principal da poeira da casca da soja, Gly m 1, passou a ser investigado, particularmente em países da Europa, por estar relacionado a surtos de asma ocorridos nos portos de algumas cidades, relacionados ao descarregamento dos grãos de soja nos silos (GONZALEZ et al, 1992; COCCO et al, 1995; CRUZ et al, 2000; GONZALEZ et al, 2000; ROVIRA et al, 2010). Com o avanço das pesquisas na área, compreendeu-se que a dispersão do alérgeno estava associada a questões climáticas locais, bem como aspectos genéticos populacionais (SUNYER et al, 1992; GIJZEN et al, 2003; ANTONICELLI et al 2010). Novas estratégias no combate a dispersão deste alérgeno passaram a ser utilizadas nos portos da Europa, como colocação de filtros nos silos, o que levou a redução significativa do Gly m 1 na atmosfera e impediu a ocorrência de novos surtos de asma (RODRIGO et al, 2004).

Contudo, apesar da importância do Gly m 1 como aeroalérgeno, os estudos não avançaram na investigação da presença do alérgeno nas áreas de plantio, colheita e agroindústria da soja, ou seja, locais de possível dispersão. Na última década não existem levantamentos aerobiológicos deste alérgeno em nenhuma localidade do mundo. No Brasil, Pinto et al (2007), evidenciaram a sensibilização

frequente à soja em trabalhadores e habitantes das áreas produtoras de soja, mas sem realizar avaliações da concentração do alérgeno na atmosfera.

O alergologista deve estudar a flora e fauna do seu local de atuação e investir esforços na compreensão da aerobiologia de sua região. Isto exige monitoramentos periódicos a fim de identificar poluentes, novos aeroalérgenos, avaliar as concentrações locais de materiais particulados, gases e alérgenos e identificar mudanças ocorridas no decorrer dos anos. Este conhecimento é fundamental para prevenção e tratamento personalizado dos pacientes com doenças respiratórias alérgicas (ROSARIO, 2017; EGUILUZ-GRACIA et al 2020a).

1.1 HIPÓTESES

A primeira hipótese deste estudo, é que em decorrência da forte presença da cultura da soja e de sua agroindústria nas proximidades da região urbana de Maringá, o alérgeno principal da casca de soja, Gly m 1, possivelmente deve estar na atmosfera em concentrações sensibilizantes para indivíduos predispostos, podendo inclusive, desencadear sintomas respiratórios alérgicos, como asma e rinite.

A segunda hipótese é que essas concentrações podem ser afetadas pelos fatores meteorológicos diários, possibilitando maior ou menor dispersão como já relatado na literatura (GIJZEN et al 2003; ANTONICELLI et al 2010; ROVIRA et al 2010).

1.2 OBJETIVOS

1) Verificar a presença e concentrações de Gly m1 no ar (proteína hidrofóbica presente na casca da soja), em um ponto de coleta na cidade de Maringá-PR, de forma periódica, durante 12 meses.

2) Associar os níveis encontrados de Gly m 1 com os fatores climáticos do local (temperatura, umidade relativa do ar, precipitação, insolação e vento).

1.3 JUSTIFICATIVA

O Gly m 1, alérgeno derivado da casca da soja, já foi descrito como causador de sensibilização e sintomas respiratórios em indivíduos com exposição ocupacional (como trabalhadores da agroindústria e portos) e exposição indireta (pela presença do alérgeno no ar) com a soja (GONZALEZ et al, 2000; PINTO et al, 2007; ANTONICELLI et al, 2010; ROVIRA et al, 2010). O Brasil é um grande produtor de soja e a cidade de Maringá encontra-se em uma região de agroindústria, na qual a soja tem um papel relevante. Nesta localidade, encontra-se uma grande cooperativa de beneficiamento de soja em perímetro urbano. Apesar da aparente importância deste alérgeno como potencial sensibilizador e causador de sintomas respiratórios, a mensuração das concentrações em ar ambiente do Gly m 1 não foi realizada em nenhuma localidade do Brasil até o presente momento.

A avaliação do componente alergênico, Gly m 1, utiliza-se de um método de alta sensibilidade e especificidade. O emprego da alergologia molecular na identificação dos alérgenos ambientais se mostra mais fidedigno em termos de concentração e dispersão dos alérgenos atmosféricos que outros métodos (GONZALEZ et al, 2000; VALENTA et al, 2018; CARRENÕ et al, 2020). Os achados serão de grande contribuição regional e nacional, tendo em vista o total desconhecimento atual das concentrações deste alérgeno no ar, bem como possíveis padrões de dispersão dos alérgenos de acordo com os fatores climáticos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 OS AEROALÉRGENOS E O ALERGISTA

O conhecimento da flora de aeroalérgenos locais, bem como sua distribuição de acordo com as estações e mudanças climáticas, é de suma importância na prática do alergista. O tratamento das principais alergias respiratórias baseia-se na prevenção, na terapêutica medicamentosa e na imunoterapia alérgeno específica. Sem conhecer o alérgeno causador, a prevenção, bem como a imunoterapia tornam-se inviáveis. Desta forma, o monitoramento aerobiológico periódico dos alérgenos é fundamental para uma boa prática médica, tendo em vista as mudanças climáticas, de fauna, flora, e poluentes, propiciando assim, tratamento individualizado para cada paciente (BUTERS, 2014).

Neste contexto, a alergologia molecular permitiu o avanço da detecção com precisão dos componentes alergênicos, permitindo diferenciar IgE específicas clinicamente relevantes, daquelas com menor importância. Além disso, vem trazendo novos conhecimentos sobre reatividade cruzada e sensibilizações com maior risco prognóstico (ARRUDA *et al*, 2013). Como consequência, o rastreamento aerobiológico tornou-se mais específico, investigando os componentes alergênicos, melhorando assim, o entendimento do processo exposição, sensibilização e sintomas (GONZALEZ *et al*, 2000; ROVIRA *et al*, 2010; CANONICA *et al*, 2013; ARAUJO; ROSARIO; MARI, 2016).

Os primeiros levantamentos aerobiológicos extradomiciliares focavam inicialmente na detecção dos pólenes e esporos de fungos. Classicamente, o método mais simples e econômico para coleta de amostras biológicas aerotransportadas, é o gravitacional. Este método geralmente consiste em expor uma lâmina de microscópio ou placa de Petri em ambiente externo por um determinado período de tempo para posterior visualização microscópica (MULLINS; EMBERLIM, 1997). Este tipo de amostragem é essencialmente qualitativa, embora a contagem de pólenes e esporos possa ser feita por área da placa (cm²) (ROSARIO FILHO, 1983). Esta avaliação também pode ser influenciada pelo tamanho e forma das partículas, bem como movimento do ar. Pode ser tendenciosa a depender do peso e tamanho do alérgeno. Partículas muito leves, embora possam ser importantes em termos de deposição atmosférica, podem não ser devidamente representadas neste tipo de coleta (LEVETIN, 2004).

Atualmente, os instrumentos mais usados para amostragem de ar são amostradores de impactação ou impactadores. Esses amostradores separam as partículas da corrente de ar usando a inércia, com deposição do material em uma superfície sólida. Há vários equipamentos utilizados para retenção de pólen e esporos de fungos. A maioria utiliza impactação após sucção do ar, como exemplo o Burkard ou braços giratórios, como exemplo o Rotorod (FRENZ, 1999). Estes amostradores de ar podem ser classificados em amostradores de poeira total ou amostradores seletivos baseados na discriminação do tamanho das partículas. Os amostradores de poeira total são aqueles que coletam as partículas sem fazer qualquer seleção de tamanho. Geralmente possuem um único estágio e são utilizados na determinação da massa total de poeira coletada. Os amostradores seletivos, que se baseiam nas propriedades físicas, óticas, eletrostáticas e aerodinâmicas das partículas, coletam partículas com diferentes faixas de tamanho. Da mesma forma que o método gravitacional, a coleta por impactadores permite avaliar a morfologia do material por microscopia ou caracterizá-lo por meio de cultura, com a vantagem da quantificação do ar amostrado em volume (m^3) por tempo (LEVETIN, 2004).

Contudo, no caso dos alérgenos de pólen por exemplo, o monitoramento por meio da contagem de grãos demonstra resultados diversos. Os grãos de pólen de diferentes famílias de gramíneas apresentam morfologia similar e isto torna a distinção entre eles por inspeção visual bastante morosa. A liberação de alérgenos por grão de pólen pode variar com fatores ambientais capazes de interferir na liberação de alérgenos como umidade relativa do ar, chuvas e poluentes (CECCHI et al., 2010; ROSARIO, 2017; D'AMATO et al., 2020a). A elevada umidade do ar leva a um processo semelhante ao que ocorre na polinização em condições fisiológicas. Já as tempestades levam a um rompimento dos grãos por choque osmótico, liberando as partículas de alérgenos (DAVIES et al., 2018; HEW et al., 2018; D'AMATO et al., 2019). Os poluentes, especialmente os provenientes da exaustão de motores, são considerados indutores de liberação de alérgenos de pólen (KNOX, 1993; ANTO; SUNYER; NEWMAN, 1996; KNOX et al., 1997). Portanto, não basta o pólen estar em dispersão, mas há que se demonstrar que seus alérgenos estão presentes no ar e causam sintomas. O mesmo vale para o alérgeno da poeira da soja.

A aerobiologia molecular vem permitindo uma melhor avaliação da exposição real aos alérgenos na atmosfera. Buters e o grupo HIALINE (2015) estudaram a variação do Phl p 5, alérgeno da gramínea *Phleum pratense*, na atmosfera

correlacionando a presença dos grãos de polens em diversas localidades. Para isto, utilizaram o método de coleta por impactador em cascata de alto volume. Foi encontrado uma liberação média de 2,3 pg de Phl p 5 por grão de pólen, contudo, a variação do intervalo de alérgenos foi grande (1 a 9 pg por grão de pólen) mostrando que a contagem de grãos pode ser um método inadequado de avaliação da potência alergênica do pólen. Assim, os estudos mais recentes têm buscado associar o método de coleta por impactadores com a análise molecular dos componentes alergênicos na atmosfera a fim de compreender o real impacto da exposição aos indivíduos susceptíveis (BUTERS et al., 2008; CARREÑO, 2020).

Outra questão implicada nas manifestações respiratórias alérgicas envolve o exossoma, ou seja, todas as exposições ambientais acumuladas no decorrer da vida, o que parece exercer um papel fundamental na sensibilização e manifestação de sintomas. Não somente os aeroalérgenos, mas os níveis de endotoxinas transportadas pelo ar e composição microbiana são fatores componentes do exossoma (AGACHE et al., 2019; CECCHI et al., 2020). Exposições concomitantes a poluentes atmosféricos, como ozônio e óxido nítrico, e aeroalérgenos podem aumentar a inflamação das vias aéreas, levando a exacerbações das doenças alérgicas respiratórias (D'AMATO et al., 2020b).

2.2 A SOJA NO BRASIL E PARANÁ

A soja, nome científico *Glycine max*, é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae empregada como alimento tanto para humanos quanto para animais. A soja hoje cultivada mundo afora é muito diferente dos ancestrais que lhe deram origem. Nos seus primórdios, a soja era uma planta rasteira e habitava a costa leste da Ásia, principalmente a região norte da China. Sua evolução ocorreu de plantas oriundas de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China (BONETTI, 1977; BONATO; BONATO, 1987).

Apesar de explorada intensamente na dieta alimentar do Oriente há mais de cinco mil anos, o Ocidente ignorou o seu cultivo até o século 19, quando os Estados Unidos (EUA) iniciaram sua exploração comercial, primeiro como forrageira e, posteriormente, como grão para a indústria de farelos e óleos.

O desenvolvimento da soja no Brasil iniciou-se quando os primeiros cultivares foram introduzidos no país e testados no estado da Bahia (BA), em 1882. O germoplasma fora trazido dos EUA e não teve êxito na Bahia, pois a planta não era adaptada para as condições de baixa latitude daquele estado (12°S). Nas décadas seguintes, novos cultivares foram testados para as condições dos estados mais meridionais do Brasil (Sul e Sudeste brasileiros) (BONETTI, 1977; BONATO; BONATO, 1987).

A soja é o principal grão oleaginoso cultivado atualmente. Tornou-se a mais versátil mercadoria comercializada, por ser uma fonte amplamente utilizada de proteína, óleo e biocombustível. Os produtos de soja são cada vez mais utilizados na indústria alimentícia, como texturizadores e emulsificantes. A farinha de soja é frequentemente adicionada a produtos de panificação. O óleo de soja é a segunda maior fonte de óleo vegetal mundial e também é usado em produtos como biodiesel e detergentes. Para o preparo da farinha e do óleo, a soja é previamente descascada e depois triturada. A casca da soja, subproduto deste processo, também é comercializada como ração animal por ser fonte de fibras e proteínas (KLEINE-TEBBE; BEYER; EBISAWA, 2016; ABIOVE 2020).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja e, dentre os maiores produtores (EUA, Brasil e Argentina), é o que possui o maior potencial de expansão da área cultivada. A trajetória do crescimento da produção de soja, sem paralelo na história agrícola brasileira, começou na década de 1960 e, em menos de vinte anos, converteu-se na cultura líder do agronegócio do país. A safra brasileira 2018/2019, ultrapassou a marca de 120 milhões de toneladas (CONAB – EMBRAPA 2020).

Segundo dados do IBGE (2019), o Paraná é o segundo maior produtor nacional, tendo produzido mais de 18 milhões de toneladas em 2019, ficando atrás apenas do Mato Grosso.

Muitos fatores contribuíram para que a soja se estabelecesse como uma importante cultura no Paraná a partir dos anos 70, mas especialmente em Maringá, na região norte do estado. A topografia plana (que facilita a mecanização), o solo roxo de excelente qualidade e o regime pluviométrico favorável foram de grande relevância.

Grande parte das agroindústrias da região de Maringá está localizada junto às principais zonas produtoras e o produto para processamento é adquirido diretamente do produtor. Assim, a cadeia produtiva e a logística envolvida acabam por concentrar cooperativas e indústrias de beneficiamento próximas (ou até mesmo

dentro) das zonas urbanas, além de rodovias, também muito próximas à cidade, para transportar os grãos da lavoura até as indústrias. Além disso, como o principal destino da soja e seus derivados é a exportação, cerca de 45% do grão, 50% do farelo e 25 % do óleo seguem para o mercado externo (ABIOVE 2020), o transporte até o principal ponto para seu escoamento (o Porto de Paranaguá) é feito por meio de ferrovias, que também cruzam diversas áreas da cidade.

2.3 ALÉRGENOS DA SOJA

A soja é composta por carboidratos, lipídeos, minerais, fibras e proteínas, sendo estas últimas responsáveis por cerca de 35% da composição do grão. Dentre estas proteínas, 16 são alergênicas, apresentando funções metabólicas, de armazenamento ou de proteção (BATISTA et al, 2007; L'HOCINE; BOYE 2007; KLEINE-TEBBE; BEYER; EBISAWA, 2016). Estas proteínas constituem-se como uma gama de cadeias polipeptídicas com tamanhos moleculares diferentes que foram agrupadas de acordo com coeficientes de sedimentação em frações: 2S, 7S, 11S e 15S. A fração 2S, contém 2 a 15% da proteína extraída da soja e consiste em enzimas e inibidores de proteases. A 7S compreende 35% das proteínas da soja e é constituída pela beta-conglicina, proteínas de reserva. A fração 11S, a mais representativa em percentual, correspondendo de 31 a 52% das proteínas solúveis da soja, é essencialmente composta por glicina. Já a fração 15S é composta por cerca de 10% da proteína total da soja e contém polímeros de proteínas de soja (MILLS et al, 2004; L'HOCINE; BOYE, 2007). Em 1980, Shibasaki et al descreveram a ativação de IgE pelas proteínas dos complexos 11S, 7S e 2S.

Posteriormente foram descritos os principais componentes alergênicos da soja conforme QUADRO 1 (GONZALEZ et al, 1991; RIHS et al, 1991; GONZALEZ et al, 1992; OGAWA et al, 1993; KING et al., 1995; BAUR et al, 1996; CODINA et al, 1997; MITTAG et al, 2001; HOLZHAUSER et al 2009; OECD 2012; KLEMANS et al, 2013; KLEINE-TEBBE; BEYER; EBISAWA, 2016; RIASCOS et al 2016).

Dentre estes componentes alergênicos, 8 são clinicamente relevantes como alérgenos alimentares: Gly m 3, Gly m 4, Gly m Bd 28K, Gly m 5, Gly m 6, Gly m 8 e Gly m Bd30K. Proteínas presentes na casca do grão de soja como Gly m 1 e Gly m 2, ainda foram pouco exploradas, embora sejam alérgenos inalatórios em potencial, que podem ser dispersos na atmosfera com o processamento do grão (GONZALEZ et al 1991; LADICS et al 2014; KLEINE-TEBBE; BEYER; EBISAWA 2016).

QUADRO 1 – ALÉRGENOS DA SOJA

Proteínas da soja	Alérgenos	Relevância clínica	Família
Proteína hidrofóbica (7- 8 kDa)	Gly m 1	Abundante na poeira da casca da soja. “Surtos” de asma nas cidades portuárias	Proteína de transferência lipídica
Defensina (8 kDa)	Gly m 2	Abundante na casca da soja. Apresenta homologia com proteínas de estocagem da ervilha e feijão de corda	Proteína de estocagem
Profilina (14 kDa)	Gly m 3	Alguma reatividade cruzada com a profilina da bétula	Profilina
SAM 22 (17 kDa)	Gly m 4	Homólogo a Bet v 1*. Principal alérgeno naqueles que apresentam alergia ao pólen de bétula e soja concomitante.	Proteínas relacionadas à patogênese PR-10
Beta-Conglicina (140-180 kDa)	Gly m 5	Indicador de potencial reação grave a soja	Proteínas de estocagem
Glicina (320-360 kDa)	Gly m 6	Indicador de potencial reação grave a soja	Proteínas de estocagem
SBP** (76 kDa)	Gly m 7	Alérgeno com estabilidade estrutural a processos de fabricação dos alimentos	Não descrita
2S albumina	Gly m 8	Alérgeno alimentar, apresenta alguma homologia com Ara h 2 (alérgeno do amendoim)	Prolamina
Proteína vacuolar da soja (30 – 34 kDa)	Gly m Bd 30K	Glicoproteína associada a parte oleaginosa do grão. 30% de homologia com Der p 1***	Protease
Glicoproteína tipo vicilina 7S (28 kDa)	Gly m Bd 28K	Alérgeno alimentar.	Desconhecida
Inibidor da Tripsina Kunitz (20 kDa)	Gly m TI	Presente na semente e farinha de soja. Aeroalérgeno ocupacional.	Inibidor de protease
Lecitina	Não há	Não	Lecitina
Lipoxigenase	Não há	Não	Enzimas
Desconhecida (39 kDa)	Não há	Não. Detectada na semente seca madura nos vacúolos de armazenamento de proteínas.	Desconhecida
Desconhecida (50 kDa)	Não há	Não	Homóloga da clorofila A-B proteína de ligação
PM 22-25	Não há	Não	Desconhecida

FONTE: A autora (2020)

NOTA: *alérgeno maior da Bétula**proteína da semente biotinizada; ***alérgeno maior do ácaro *D. pteronyssinus*.

2.4 AEROALÉRGENOS DA SOJA E SINTOMAS RESPIRATÓRIOS

A exposição a um aeroalérgeno em um indivíduo previamente sensibilizado pode causar sintomas oculares, nasais e de trato respiratório inferior, incluindo o desenvolvimento de asma ocupacional. Esta é uma doença caracterizada por limitação variável do fluxo de ar e hiperresponsividade das vias aéreas devido a exposição em ambiente de trabalho. Dentro do espectro de adultos asmáticos, estima-se que 5 a 15% sejam de origem ocupacional (BALMES et al, 2003). Ademais, a asma ocupacional difere da asma agravada pelo ambiente de trabalho, na qual o indivíduo já é asmático e apresenta descontrole da doença em decorrência da exposição ocupacional a um alérgeno ou irritante (HENNENBERGER et al, 2011).

O primeiro relato na literatura de asma à poeira de soja inalada em 1934 (DUKE, 1934) refere-se à descrição de cinco casos clínicos de trabalhadores que desencadearam sintomas respiratórios causados por exposição à farinha de soja. Após 2 anos, foi descrito um caso de sintomas de rinite e asma resultantes do contato com soja inalada (OLSEN; PRICKMAN, 1936). Em 1938 (WIGHTMAN) investigou-se a sensibilização ao grão de soja em trabalhadores de galpões fechados que desenvolveram asma. A exposição a farinha de soja e poeira da soja passou a ser citada como causadora de sintomas de asma ocupacional, bem como de outros sintomas respiratórios, em trabalhadores de diversas áreas como moendeiros, fazendeiros, padeiros e trabalhadores do processamento da soja (PEPYS, 1986; BUSH; SCHOECKENSTEIN; MEIER-DAVIS, 1988; ZUSKIN et al 1991).

Paralelamente a isso, em 1958, foi descrito um surto de asma no qual 100 indivíduos em crise procuraram a emergência de um hospital em New Orleans (EUA) em um único dia. Através de análises retrospectivas de prontuários, notou-se que esses surtos vinham ocorrendo desde 1953, habitualmente nos meses de outubro. A causa para tais surtos era atribuída a algum aeroalérgeno desconhecido e que pelas condições favoráveis daquele mês, como ventos de baixa velocidade, conseguia permanecer em maiores concentrações no ambiente (CARROLL, 1968).

Somente na década de oitenta, os surtos comunitários de asma foram associados à inalação de poeira de soja decorrentes da descarga dos grãos em silos no porto de Barcelona (ANTO et al, 1989). Ainda no final desta mesma década, casos semelhantes foram registrados em Cartagena, também na Espanha (HERNANDO et al, 1989), bem como em Nápoles, Itália (COCCO et al, 1995). Avaliar as epidemias de

asma ocorridas em Barcelona foram essenciais para os estudos na área, devido ao grande número de ocorrências, permitindo identificar a poeira da soja como a responsável pelos surtos de asma, dada a relação clara dos descarregamentos dos grãos de soja nas docas com os períodos de crises.

Em 1990, Rodrigo et al identificaram que os episódios de asma estavam relacionados a um mecanismo IgE mediado contra uma proteína de baixo peso molecular presente na casca da soja.

Em 1992, Gonzalez et al identificaram o alérgeno responsável por 70% da alergenicidade da casca de soja, nomeando-o assim de Gly m 1. Na ocasião, identificou-se IgE específica para este alérgeno em 90% dos indivíduos com surtos de asma em Barcelona e Cartagena (GONZALEZ et al., 1995). A fim de quantificar o aeroalérgeno implicado nas epidemias de asma com alta sensibilidade, esforços foram realizados para o desenvolvimento de imunoensaios. Assim progrediu-se de imunoensaios competitivos ou de inibição (CRUZ et al., 2000), que utilizavam soros de indivíduos sensibilizados, para ensaios em sanduíche com anticorpos policlonais e monoclonais (GONZALEZ et al., 2000; GOMEZ-OLLES et al., 2006). No ano 2000, Gonzalez et al. desenvolveram e descreveram a técnica de ELISA sanduíche para identificação do Gly m 1, método 10 vezes mais sensível para detecção do alérgeno se comparado ao RAST (radioallergosorbent test) por inibição.

Em decorrência do grande número de casos de asma, ainda na década de 90, foram instalados filtros nos silos de armazenamento em Barcelona, com significativa diminuição dos níveis de poeira de soja na atmosfera da cidade. Além dessas medidas, notou-se que fatores climáticos como alta pressão e direção do vento do porto para a cidade eram responsáveis pela maior dispersão do alérgeno (ANTO et al., 1993; RODRIGO et al., 2004). Sugeriu-se também que as partículas da poeira da soja poderiam ser pequenas o bastante para viajar longas distâncias, bem como apresentarem grande deposição pulmonar. Villalbi et al. (2004) observaram que mesmo em baixas concentrações do alérgeno no ar, havia persistência dos sintomas na população sensibilizada à soja, embora estes sintomas fossem mais brandos.

A presença do Gly m 1 foi quantificada em algumas cidades, em geral, portuárias. Ainda em Barcelona, Gonzalez et al. (2000), dosaram o alérgeno encontrando um valor mediano baixo, mas ainda sim com presença de picos (797 ng/m³), apesar das medidas de controle portuárias e presença de filtros nos silos. Em 2003, Gijzen et al. procuraram avaliar a concentração de Gly m 1 em pontos distintos

do Canadá (região urbana e rural), onde haviam cultivos de soja. Os valores encontrados foram considerados relativamente baixos, com alguns picos, o maior deles de 73 ng/m³, durante a colheita. Em Tarragona, Espanha, Rovira et al. (2010) encontraram níveis moderados com máximo de 441 U/m³ (equivalente a 441 ng/m³). Em Ancona, Itália, local frequente de descarregamento de soja, foram encontradas concentrações de 0,4-141 ng/m³ de Gly m 1, sendo os maiores valores em filtros coletados no porto (média 22,1 ng/m³ \pm 41,3), enquanto os filtros coletados a 5 km da região portuária apresentaram níveis baixíssimos do alérgeno (0,6 ng/m³ \pm 0,8). Estes dados foram compatíveis com a inexistência de surtos de asma ocupacional naquela cidade. As variações das concentrações entre as localidades, possivelmente se devem a fatores ambientais (clima, umidade, poluição) inerentes a cada local, o que propiciam ou não a dispersão dos alérgenos, bem como o desencadeamento de sintomas (ANTONICELLI et al., 2010). Contudo, ainda não estão esclarecidos quais os níveis de Gly m 1 capazes de causar sensibilização ou desencadeamento dos sintomas. Predisposição genética, presença de atopia pessoal e tabagismo são fatores relacionados a apresentação dos sintomas (SUNYER et al, 1992; ANTO; SUNYER; NEWMAN, 1996; SORIANO et al., 1997).

Em 1999, Gly m 1 e Gly m 2 foram identificados como alérgenos sensibilizantes após realização de ensaio com soro de pacientes com asma ocupacional, confirmando a sensibilização aos alérgenos da casca de soja (CODINA; LOCKEY, 1998; CODINA et al., 2000). Durante surto epidêmico de asma comunitária na cidade de Tarragona, Espanha, analisou-se as características da enfermidade prévia, parâmetros clínicos das crises e a evolução imediata de 15 pacientes que procuraram às unidades de emergência, por crise de asma, em dias epidêmicos. Destes, 13 estavam sensibilizados à proteína da casca da soja (GARCIA-ORTEGA et al., 1998).

O estudo nacional PROAL observou a evolução da sensibilização aos alérgenos em diversas regiões do Brasil em um intervalo de 12 anos. Na avaliação realizada em 2016, a sensibilização por teste cutâneo ao extrato total de soja entre as crianças foi de 15,8%., independente de exposição à soja (ARANDA et al., 2018). Da mesma forma, em um levantamento na Argentina, em asmáticos sujeitos a diferentes níveis de exposição, detectou-se alta sensibilização aos alérgenos da casca de soja (15%), desta vez, por teste cutâneo com extrato da casca de soja. Além disso, notou-se maior frequência e gravidade dos sintomas nos asmáticos com teste positivo para

soja, se comparados àqueles asmáticos com teste negativo para este alérgeno (CODINA et al., 2000). Um estudo mais recente com sibilantes recorrentes de 6 meses a 10 anos, evidenciou 1% de sensibilização em teste cutâneo ao extrato da casca da soja, sugerindo que este pode ser um sensibilizante mesmo em crianças que não tem exposição direta ao grão (PENDINO et al., 2011).

Heederik et al. (2014) identificaram que indivíduos sensibilizados à soja, vivendo nas proximidades de uma indústria de processamento, apresentaram mais sintomas respiratórios, necessidade de broncodilatadores e queda do pico de fluxo expiratório nos dias em que o vento era direcionado para a região da vizinhança. Isso corrobora com fato de que não só trabalhadores da soja estão sujeitos a apresentarem sintomas e que os fatores meteorológicos podem contribuir para a dispersão da soja no ar.

No Brasil, um estudo realizado nos estados de São Paulo e Goiás avaliou trabalhadores da agroindústria da soja e população da região, evidenciando que a poeira de soja pode agir como potente sensibilizadora de indivíduos expostos, tanto em meios rurais quanto urbanos, quer no meio fabril ou nos arredores (PINTO et al., 2007). Foi notado também alta prevalência de positividade aos testes de puntura para fungos, sugerindo que estes são co-responsáveis pela sensibilização dos indivíduos expostos à poeira da soja (CODINA; LOCKEY, 1998; PINTO et al., 2007).

Os riscos potenciais da poeira de soja inalada diferem de acordo com a natureza constituinte desse material, bem como do tamanho das partículas. Mason et al. (2017) realizaram um estudo com 7 classes de matérias-primas de soja, sendo 5 delas essencialmente farelo sem casca e 2 delas produtos da casca de soja. Como esperado, evidenciaram altíssimas quantidades de Gly m 1 nos produtos da casca, contudo, os outros produtos descascados também apresentaram concentrações moderadas de Gly m 1. Os produtos da casca da soja também apresentaram maiores níveis de endotoxinas o que potencialmente pode contribuir para os sintomas respiratórios.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 TIPO DE ESTUDO

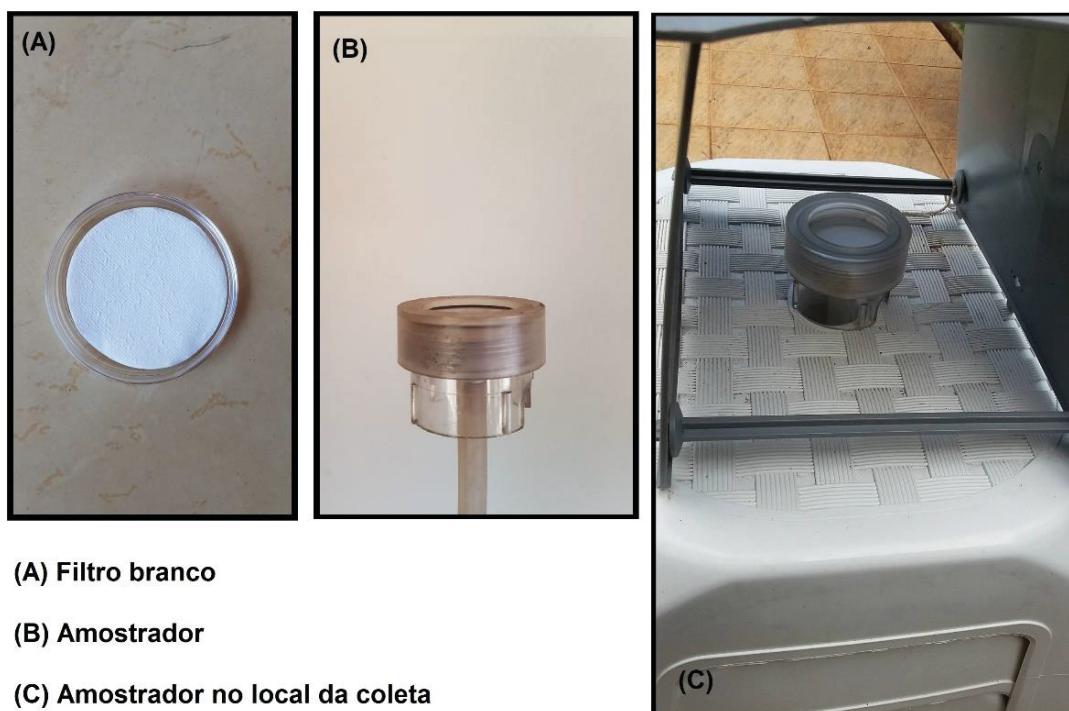
Trata-se de um estudo de coleta de amostras ambientais e dados prospectivos, de forma periódica. As coletas foram realizadas de março de 2017 a março de 2018.

3.2 AMOSTRAS

A coleta atmosférica foi realizada utilizando filtros da marca Pall (tipo Pallflex®), de 47mm de diâmetro. Estes filtros são compostos de fibras de vidro de borosilicato puro, resistentes ao calor, com revestimento de fluorocarbono (tetrafluoroetileno, TFE) resistente à umidade (PALL SCIENCES LIFE, 2020). Durante a amostragem do ar, as variações de umidade no ar ou nos gases não causam reações químicas no filtro (FIGURA 1A).

O amostrador utilizado foi de material particulado total. Este tipo de amostrador não seletivo, capta partículas de tamanhos variados, mas principalmente as maiores. Para o objetivo deste trabalho, o impactador em cascata não se fez necessário já que cerca de 90% dos alérgenos encontram-se nas partículas maiores ($PM > 10 \mu m$) (BUTERS et al., 2010). No impactador colocava-se o filtro branco e a este acoplava-se uma mangueira (de 7 metros de comprimento) que por sua vez acoplava-se ao sistema de bomba de vácuo com medidor de volume (FIGURAS 1B e 1C). O amostrador foi posicionado em ambiente externo, cerca de 90 cm acima do solo. A bomba de vácuo (FIGURA 2A) e medidor de vazão (FIGURA 2B) ficavam próximos a rede elétrica e em local abrigado a fim de evitar danos aos aparelhos (FIGURAS 10).

FIGURA 1 – FILTRO E AMOSTRADOR



FONTE: A autora (2020)

FIGURA 2 – BOMBA DE VÁCUO (A) E MEDIDOR DE VOLUME (B)

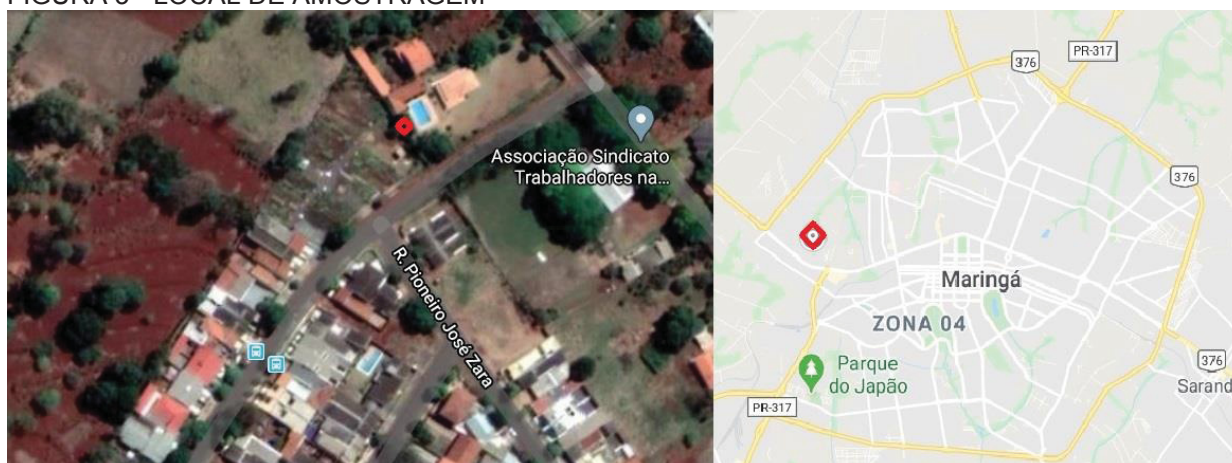


FONTE: A autora (2020)

3.3 LOCAL E DATAS DE AMOSTRAGEM

A cidade escolhida para coleta foi Maringá, localizada na região norte do Estado do Paraná. O clima da cidade é subquente e úmido com média de temperatura anual de 18°C (IBGE, 2019). O ponto de coleta foi único, escolhido por conveniência, por questões de logística e necessidade de disponibilidade de energia elétrica. Além disso, contamos com a disponibilização de apenas um impactador durante este período. As coordenadas geográficas do local de coleta são 23,41° de latitude sul, 51,97° de longitude oeste e 537 metros de altitude. Trata-se de um ponto na região urbana da cidade, contudo em localização mais periférica (FIGURA 3).

FIGURA 3 - LOCAL DE AMOSTRAGEM



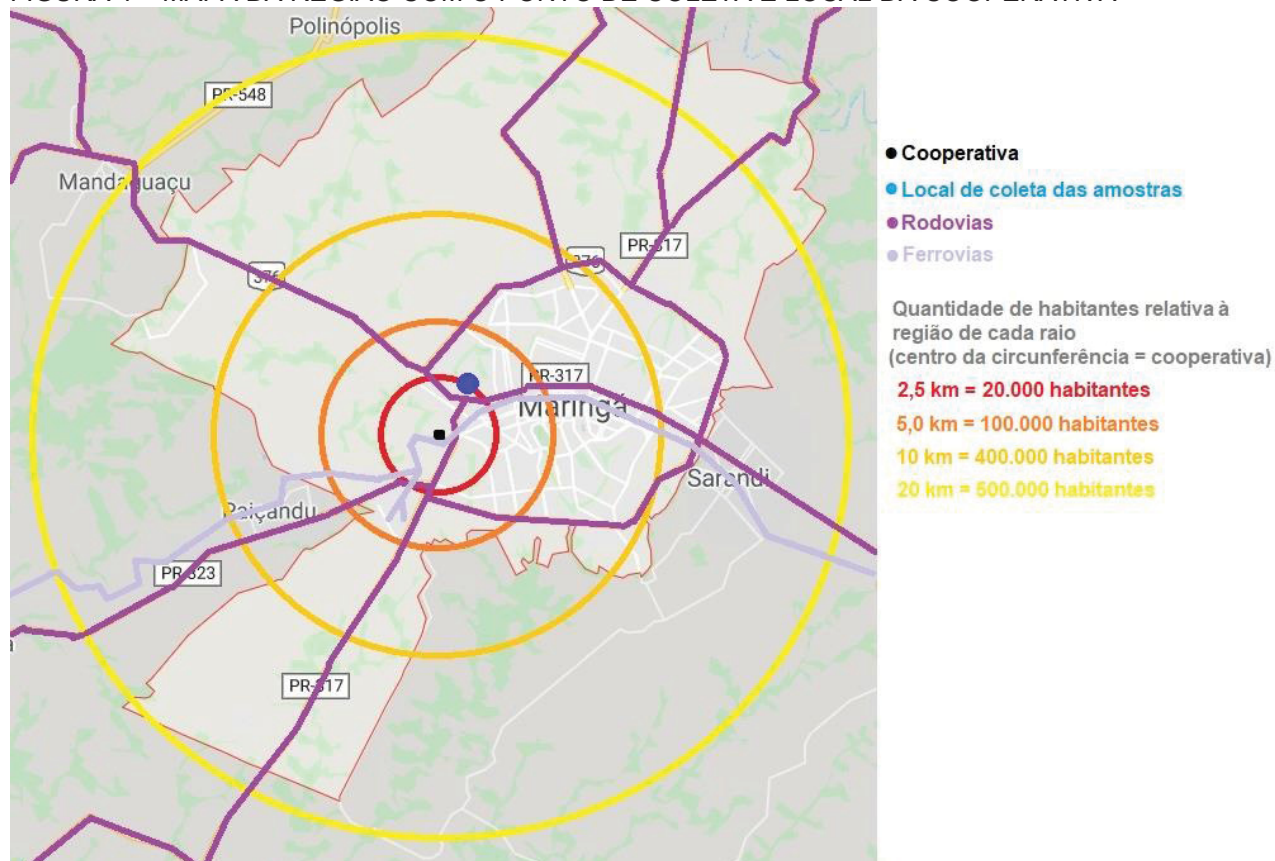
FONTE: Adaptado do GOOGLE MAPS (2019)

As coletas foram realizadas semanalmente, sendo 1 ou 2 amostras semanais de 24 ou 48 horas de duração. A escolha da duração do tempo de coleta foi baseada na avaliação piloto realizada em coletas aleatórias, de 24 horas de duração, em meses variados (THOM DE SOUZA et al., 2020a). Além disso, outros estudos prévios que utilizaram técnica similar de amostragem e análise também o fizeram em períodos de 24 a 48 horas (GIJZEN et al. 2003, ANTONICELLI et al., 2010, ROVIRA et al 2010). Após a coleta, os filtros foram acondicionados em placas de Petri e armazenados a - 20 °C.

Foram considerados critérios para exclusão dos filtros problemas técnicos durante a coleta, como queda de energia, chuva excessiva ou tempo de duração da coleta inadequado.

É importante frisar que próximo ao ponto de coleta escolhido, localiza-se uma grande cooperativa de soja da região, que dista, em linha reta, 2,5 km do local das coletas. Conforme a FIGURA 4 é possível visualizar o ponto de coleta, o local da cooperativa como centro do raio e a população aproximada residente na região de cada um destes raios no ano de 2017 (OBSERVATÓRIO DAS METRÓPOLES/CCH – NÚCLEO UEM, 2019).

FIGURA 4 – MAPA DA REGIÃO COM O PONTO DE COLETA E LOCAL DA COOPERATIVA



FONTE: A autora (2020) –

NOTA: dados populacionais de 2017 (OBSERVATÓRIO DAS METRÓPOLES/CCH- NÚCLEO UEM, 2019)

3.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS FILTROS

3.4.1 DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO

O desenvolvimento do método para a extração dos filtros foi baseado na análise de dois protocolos descritos previamente. Estes trabalhos são de grupos de pesquisa distintos que realizaram dosagem de alérgenos ambientais por ELISA, para Bet v 1 e Gly m 1, respectivamente. A idéia era obter um protocolo que possibilitasse

extrair o Gly m 1, mas também fosse um protocolo viável à extração de alérgenos de polens.

O primeiro estudo, de Buters et al. (2008), foi realizada a extração de Bet v 1, alérgeno de pólen da Bétula. Os filtros cortados em 3 partes eram mergulhados em solução tampão de NH_4HCO_3 com BSA 0,1% (albumina sérica bovina) perfazendo um volume final de 15 mL que era homogeneizado em agitador orbital por 4 horas em temperatura ambiente.

No segundo estudo, de González et al (2000), foi realizada a extração de Gly m 1. Da mesma forma, os filtros eram cortados em partes (cerca de 3 cm^2) e mergulhados em solução tampão de PBS (*phosphate buffered saline*) com BSA 1% e Tween 20® (Polisorbato) 0,1% perfazendo um volume final de 3 mL que era homogeneizado em agitador orbital durante a noite a 4°C.

Desta forma, com base nestes estudos citados, foram elaborados três protocolos para testar o meio de extração mais apropriado, considerando que o objetivo do presente estudo era avaliar Gly m 1 e armazenar o eluído para posterior análise de alérgenos polínicos nos mesmos filtros. Segue a seguir as descrições dos protocolos elaborados:

Protocolo 1: baseado essencialmente em Buters et al. (2008). Optamos por deixar o volume final de 3 mL, evitando assim uma diluição excessiva da amostra, o que poderia prejudicar a capacidade de detecção por ELISA. Além disso, foi optado por homogeneizar a amostra durante toda a noite a 4°C. Consideramos que a temperatura ambiente durante longo período de homogeneização poderia levar a desnaturação das proteínas da amostra. Desta forma, segue o protocolo 1:

Solução NH_4HCO_3 + BSA 0,1% (volume final 3 mL) e homogeneização orbital 4°C durante a noite.

Protocolo 2: foi realizado exatamente o mesmo protocolo de González et al (2000). Segue o protocolo 2:

Solução PBS + BSA 1% + Tween 20® 0,1% (volume final 3 mL) e homogeneização orbital 4°C durante a noite.

Protocolo 3: adaptado de ambos os protocolos, de Buters et al (2008) e González et al (2000). Utilizamos NH_4HCO_3 com BSA 0,1%, como no protocolo 1, e associamos Tween 20® 0,1%, perfazendo um volume final de 3 mL com homogeneização durante a noite a 4 °C, como no protocolo 2. O Tween 20 ®

(Polisorbato) trata-se de um detergente suave não iônico solubilizante de lipídeos e lipopolissacarídeos, tornando a amostra mais apropriada para a análise.

O BSA, presente em todos os protocolos é a referência padrão para a quantificação da proteína total para ensaios colorimétricos, como o ELISA. Desta forma segue o protocolo 3:

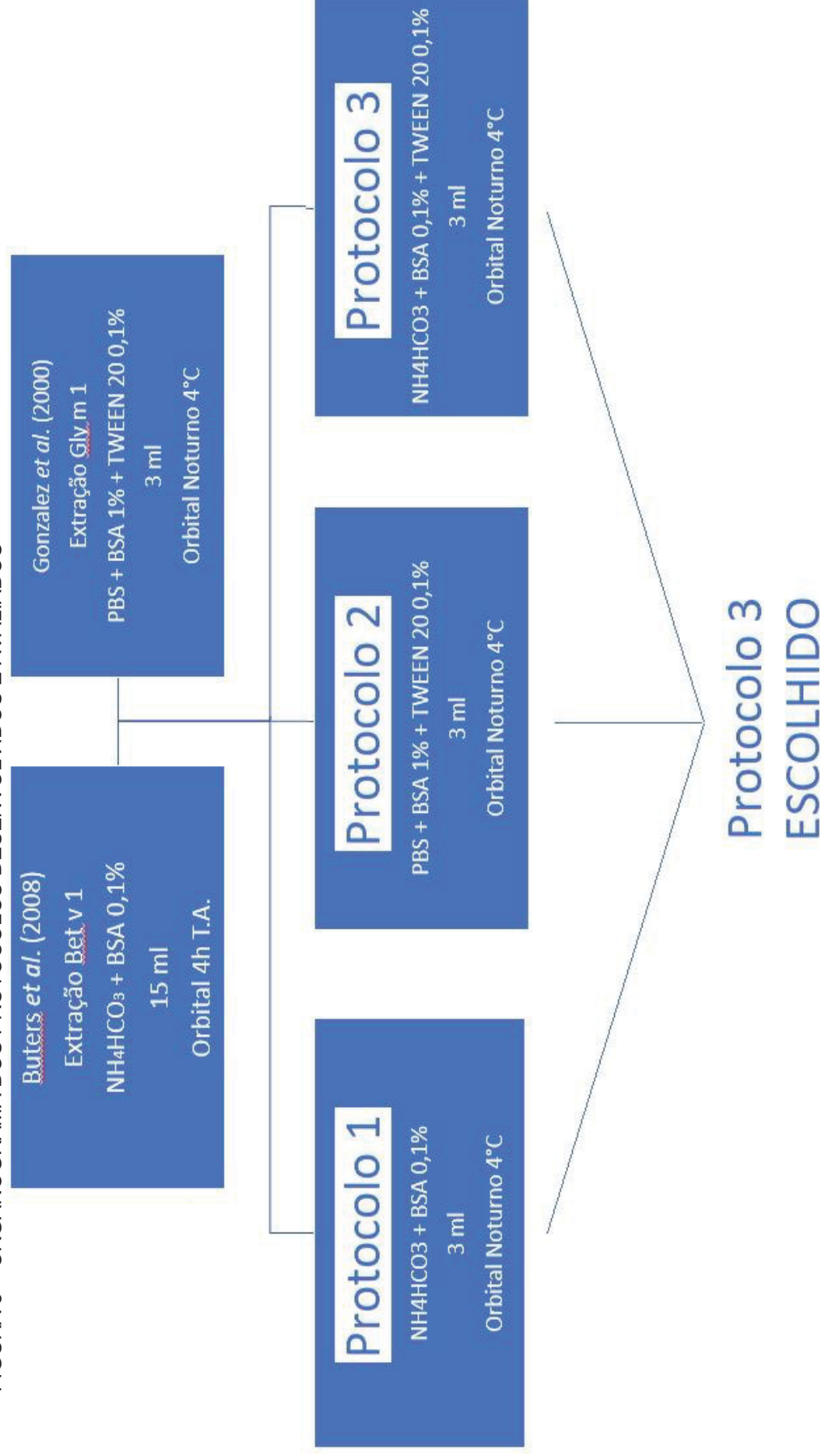
Solução NH_4HCO_3 + BSA 0,1%+ Tween 20® 0,1% (volume final 3 mL) e homogeneização orbital 4°C durante a noite.

Foram utilizados filtros testes para cada um destes protocolos. Estes filtros foram de meses variados do ano de 2016, bem como alguns filtros de 2017 que estavam no grupo dos filtros excluídos. Foram realizadas dosagens das concentrações puras e em diluição de 1:2, bem como em duplicatas. Os 3 protocolos resultaram em valores de concentrações para Gly m 1 muito similares.

Como os três protocolos se mostraram muito semelhantes em todas as extrações realizadas do estudo piloto, o protocolo 3 foi o escolhido para a análise das amostras neste estudo. A FIGURA 5 sintetiza os protocolos desenvolvidos.

A escolha do protocolo 3 se deve a algumas razões. O uso da solução tampão NH_4HCO_3 é mais utilizado para extração de pólenes, possibilitando o armazenamento do material eluído para análises futuras de alérgenos polínicos. Além disso, a extração de filtros para análise de Gly m1, até então, só havia sido realizada por meio do protocolo 2, descrito por González et al. (2000). Desta forma, este estudo também traz uma nova forma de extração para este alérgeno da soja. O uso do Tween 20® a 0,1% como surfactante, permite a retirada dos lipopolissacarídeos da amostra, sem prejuízos nas análises, por isso foi utilizado no presente estudo.

FIGURA 5 – ORGANOGRAMA DOS PROTOCOLOS DESENVOLVIDOS E AVALIADOS



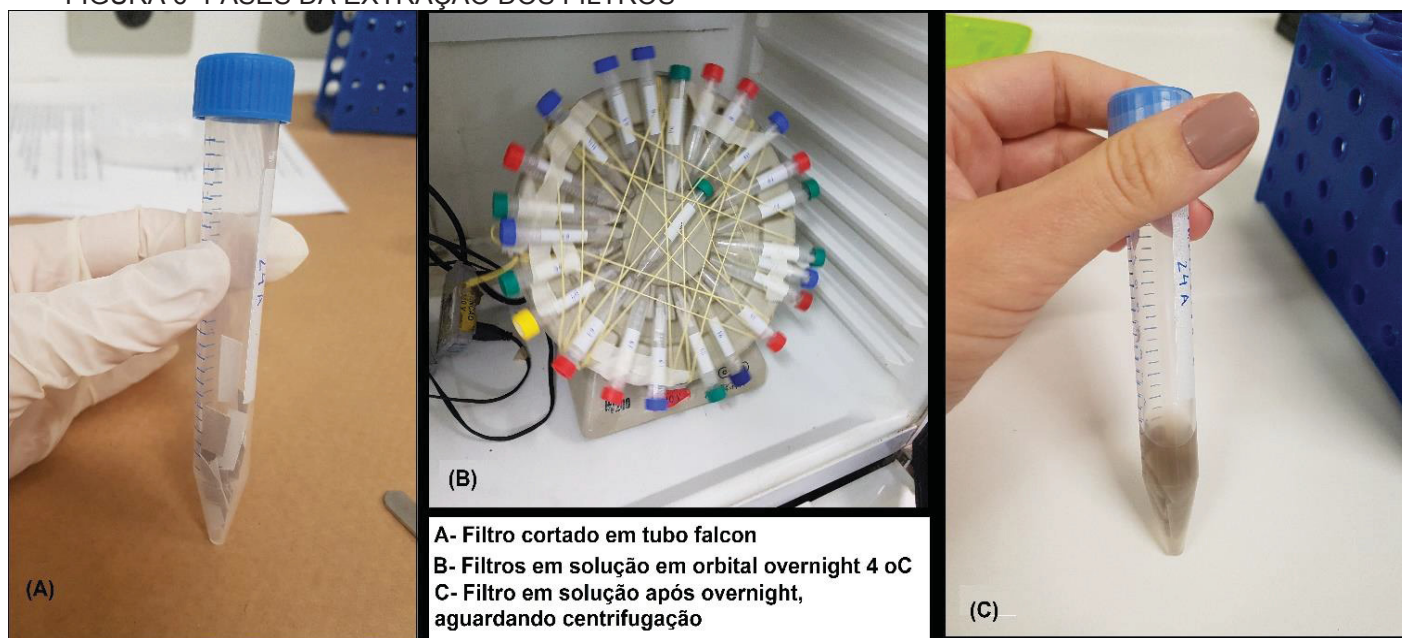
FONTE: A autora (2020)

NOTA: Bet v 1= alérgeno da bétula; NH₄HCO₃= Bicarbonato de amônio; BSA= Albumina sérica bovina; PBS= tampão fosfato salino; Tween 20%= polisorbato 20%; T.A.= temperatura ambiente.

3.4.2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL DOS FILTROS

Foram coletados 70 filtros, dos quais 60 foram utilizados no estudo. Foram excluídos 10 filtros conforme os critérios de exclusão expostos na seção 3.3. Os filtros foram cortados em pedaços de aproximadamente 3 cm² e colocados em tubos falcon de 15 mL (FIGURA 6A), misturados com a solução NH₄HCO₃ + BSA 0,1%+ Tween 20® 0,1% perfazendo um volume final de 3 mL. Os tubos foram colocados em agitador orbital a 4°C durante o período da noite (FIGURA 6B e 6C). No dia seguinte, os tubos falcon com os filtros foram centrifugados por 5 min a 4000 rpm em temperatura ambiente.

FIGURA 6- FASES DA EXTRAÇÃO DOS FILTROS



FONTE: A autora (2020)

Os sobrenadantes foram extraídos na sequência e colocados em tubos eppendorf e novamente centrifugados por mais 5 minutos a 4000 rpm em temperatura ambiente. Após esta segunda centrifugação, os sobrenadantes foram novamente extraídos, homogeneizados e aliquotados em novos tubos eppendorf e armazenados a -80°C para posterior realização por ELISA.

3.4.3 ANÁLISE POR ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) PARA Gly m 1

ELISA é uma técnica de imunoensaio enzimático colorimétrico utilizada para quantificação de substâncias solúveis como proteínas, peptídeos, anticorpos e hormônios. Sua principal vantagem é alta sensibilidade e especificidade, permitindo quantificar baixas concentrações da substância (FORTE, 2008). O ELISA pode ser do tipo direto, indireto, sanduíche e de inibição. A técnica utilizada para a pesquisa da concentração do alérgeno Gly m 1 foi do tipo sanduíche.

O ELISA tipo sanduíche requer dois anticorpos diferentes que se liguem especificamente ao antígeno presente na amostra investigada, sendo que cada anticorpo deve reagir com epítomos distintos. O primeiro anticorpo (ligado à placa do ELISA) é chamado de anticorpo de captura ou anticorpo de revestimento, enquanto o segundo anticorpo detecta o antígeno imobilizado e é chamado de anticorpo de detecção (FIGURA 7). Tais anticorpos são conhecidos e devem ser validados para trabalhar em combinação, pois não devem competir pela ligação ao antígeno, permitindo resultados altamente precisos. Podem ser usadas combinações de anticorpos monoclonais e policlonais, mais frequentemente o monoclonal como anticorpo de revestimento e o policlonal como anticorpo de detecção. Por fim, o anticorpo de detecção liga-se a outro anticorpo ou substrato que se ligará a uma enzima, no caso do ensaio utilizado, a peroxidase, que por sua vez reagirá com a substância cromógena.

3.4.3.1 DESCRIÇÃO DO ELISA PARA Gly m 1

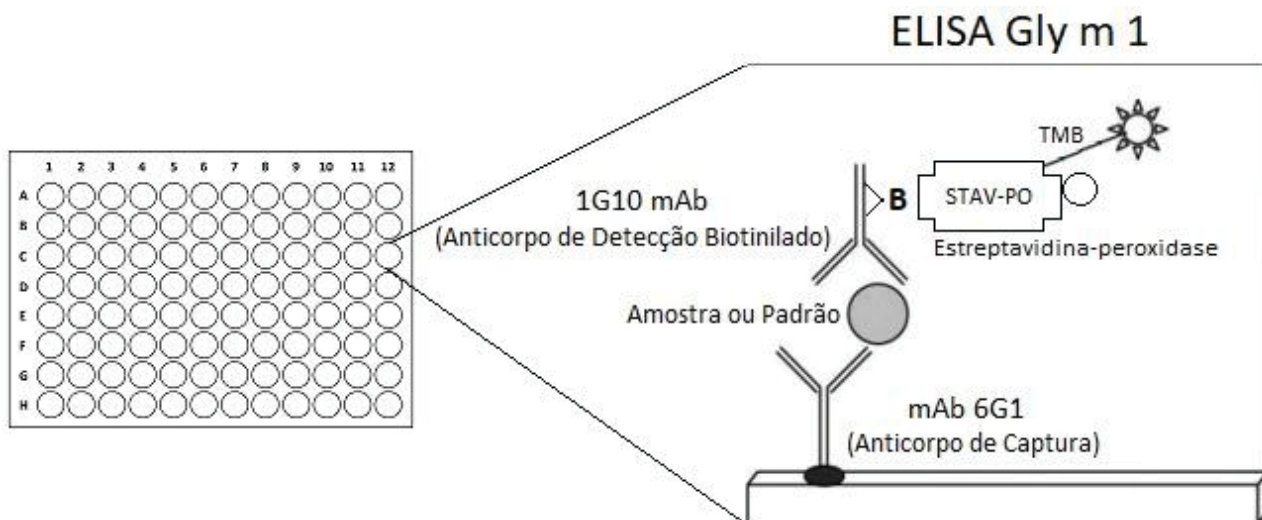
Os testes foram realizados conforme descrito por Gonzalez et al (2000). Foram utilizadas placas de ELISA pré-sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-Gly m 1, mAb 6G1 (ALK-Abelló® Ref: REA01-81946). Primeiramente foram preparadas a solução de lavagem das placas e o tampão de diluição. Na sequência foi preparado o substrato para curva padrão. O padrão para Gly m 1 (ALK-Abelló® Ref: ST-M0424) contém 9,37 µg por frasco, sendo diluído em 1:625 para realização do ponto de maior concentração e depois em diluições de 1:2, sucessivamente. Desta forma, foi construída a curva padrão com 8 pontos, a saber: 1º ponto 15 ng/mL de Gly m1; 2º ponto 7,5 ng/mL; 3º ponto 3,75 ng/mL; 4º ponto 1,875 ng/mL; 5º ponto 0,938

ng/mL; 6º ponto 0,469 ng/mL; 7º ponto 0,234 ng/mL e 8º ponto 0,117 ng/mL. Para cada placa de ELISA Gly m1, a curva padrão foi feita em duplicata. Após a diluição dos componentes da curva padrão, foi realizada a preparação do controle positivo de Gly m 1 (ALK-Abelló® Ref: N0048). O controle foi preparado em diluição de 1:10, conforme orientação do fabricante sendo a concentração final esperada entre 17,2 a 29 ng/mL, considerado o fator diluição. Caso contrário, os resultados dos testes não são confiáveis. Na sequência, foram preparadas as amostras dos filtros, que já encontravam-se eluídas, conforme descrito previamente. Foram então colocadas em temperatura ambiente e diluídas a 1:2 para o preparo de ELISA.

Primeiramente, foram realizadas as lavagens das placas de ELISA pré-sensibilizadas por 3 vezes seguidas. Este processo de lavagem das placas foi realizado em todas as etapas após a incubação de qualquer substância. Todas as fases do processo foram realizadas em temperatura ambiente.

Em seguida, foi realizada a adição, em duplicata, de 100 uL por poço da placa, dos pontos da curva, controle positivo, branco e amostras. Durante o período de incubação de 1 hora, o anticorpo monoclonal biotinilado anti Gly m 1, 1G10 mAb (ALK-Abelló® Ref: 02-02-2016) foi preparado em tampão de diluição a 1:2000. Este anticorpo de detecção, neste caso está ligado à biotina. Na sequência, foi adicionado 1G10 mAb diluído 100 uL/poço para nova incubação por mais 1 hora. Estreptavidina-peroxidase conjugada (STAV-PO, Thermo Fisher-Scientific® Ref. 21124, lote 111-BD88/2016) foi diluída em tampão a 1:20000. A estreptavidina é uma proteína tetramérica com altíssima afinidade pela biotina, o que permite uma forte ligação entre ambas com amplificação do sinal no ELISA, aumentando a sensibilidade do ensaio. A peroxidase, enzima de detecção que liga-se ao substrato, e TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina), foram adicionados 100 uL/poço na sequência. Após a adição do TMB, as placas são incubadas em ambiente escuro, surgindo a coloração nos poços (FIGURA 7). A reação é então interrompida com 4N H₂SO₄ e, feita a leitura por espectrofotometria, entre o comprimento de onda de 450nm e 650nm (FIGURA 8 e FIGURA 9). A densidade ótica em cada poço, permite inferir as concentrações do alérgeno nas amostras (FIGURA 10).

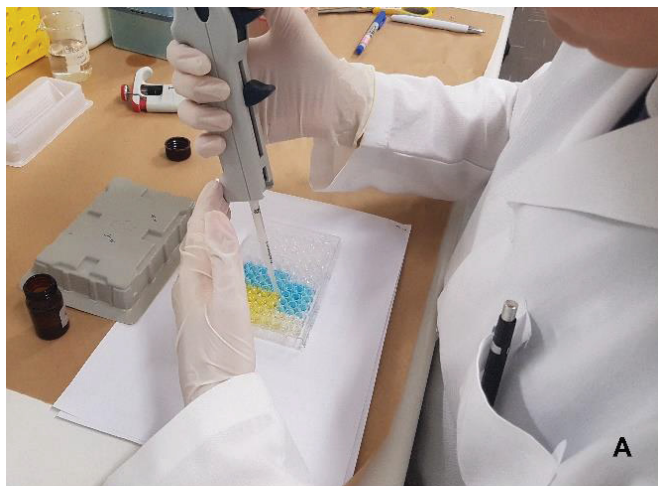
FIGURA 7- DETALHAMENTO DO ELISA PARA GLY M 1



FONTE: A autora (2020)

NOTA: TMB= tetrametilbenzidina; B= biotina

FIGURA 8 – ETAPA FINAL DA TÉCNICA DE ELISA



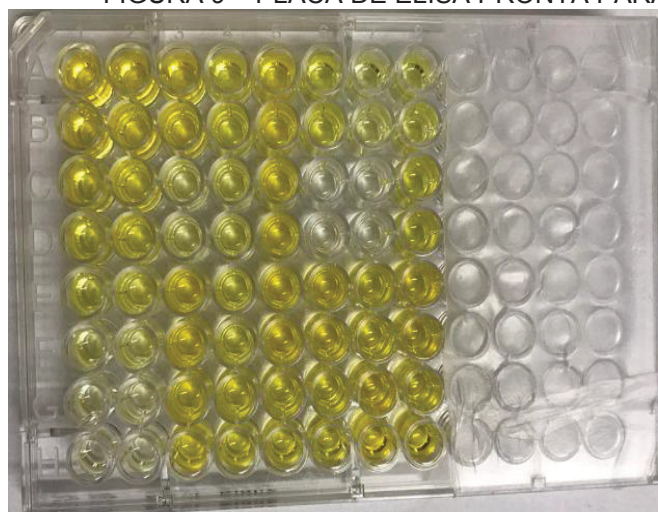
A - Após TMB, parada da reação com 4N H₂SO₄

B - Leitura da placa por espectrofotometria



FONTE: A autora (2020)

FIGURA 9 – PLACA DE ELISA PRONTA PARA LEITURA POR ESPECTOFOTOMETRIA



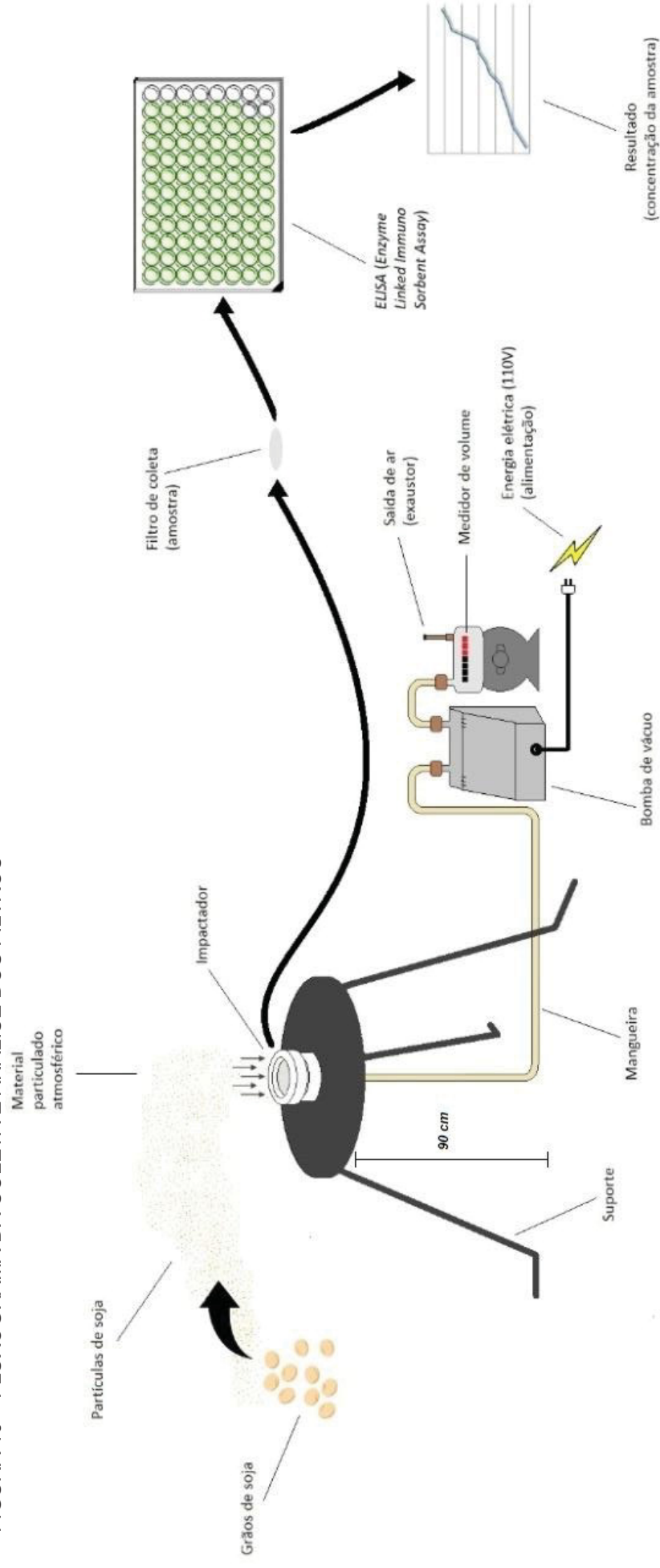
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S ₁	S ₁	X ₁	X ₅	X ₉	X ₁₃	X ₁₆	X ₁₉				
B	S ₂	S ₂	X ₁	X ₅	X ₉	X ₁₃	X ₁₆	X ₁₉				
C	S ₃	S ₃	X ₂	X ₆	X ₁₀	D	B	P				
D	S ₄	S ₄	X ₂	X ₆	X ₁₀	D	B	P				
E	S ₅	S ₅	X ₃	X ₇	X ₁₁	X ₁₄	X ₁₇	X ₂₀				
F	S ₆	S ₆	X ₃	X ₇	X ₁₁	X ₁₄	X ₁₇	X ₂₀				
G	S ₇	S ₇	X ₄	X ₈	X ₁₂	X ₁₅	X ₁₈	X ₂₁				
H	S ₈	S ₈	X ₄	X ₈	X ₁₂	X ₁₅	X ₁₈	X ₂₁				

FONTE: A autora (2020)

NOTA: S₁, S₂, S₃, S₄, S₅, S₆, S₇, S₈ = pontos da curva-padrão respectivamente numerados de 1 a 8; X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ a X₂₁ = amostras analisadas; D=controle negativo tampão diluição; B= controle negativo filtro branco; P= controle positivo do fabricante.

Tanto a curva padrão, controle positivo e os brancos (tampão diluição e filtro branco), quanto as amostras, foram analisadas em duplicata (FIGURA 9). Após a primeira análise das amostras com diluição 1:2, aquelas que apresentaram densidade ótica com coeficiente de variação > 10% entre si, ou apresentaram valores superiores ao limite máximo de detecção foram separadas para análise em outras diluições. Inicialmente a diluição das amostras em 1:100 foi analisada. Esta diluição precisou ser realizada em 37 das 60 amostras. Ainda assim, 10 amostras atingiram o limite superior da detecção e estas passaram por outra análise em diluição de 1:1000. Assim estabeleceu-se os resultados finais da concentração de Gly m 1.

FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DA COLETA E ANÁLISE DOS FILTROS



FONTE: A autora (2020)

3.6 DADOS METEOROLÓGICOS

Foram coletados os dados meteorológicos diariamente de março de 2017 a março de 2018. São eles: temperatura máxima, mínima e média compensada; umidade relativa; precipitação; velocidade e direção do vento e insolação. Os dados foram extraídos do site do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia) e se referem a estação meteorológica de Maringá (OMM:83767, latitude: -23,4; longitude -51,91; altitude: 542 m). As coletas dos dados nas estações do INMET ocorrem às 12h, 18h e 24h diariamente. Alguns dados são coletados apenas às 12h e 24h de cada dia.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram registrados em planilha eletrônica, conferidos e exportados para posterior análise estatística (Microsoft Excel®).

A estimativa de diferença entre médias e medianas entre grupos independentes foi realizada pelo teste de *t student* e Mann-Whitney, respectivamente, com significância estatística para $p < 0,05$ e IC (intervalo de confiança) de 95%.

Para avaliação da correlação entre duas variáveis contínuas, como concentração do alérgeno e temperatura, utilizou-se a correlação de Pearson (R), sendo que o valor do coeficiente de correlação (R) varia de + 1 (correlação positiva das variáveis) a -1 (correlação negativa das variáveis) com $p < 0,05$. Valores de R de 0 a $\pm 0,3$ indicam correlação desprezível, de $\pm 0,3$ a $\pm 0,5$ correlação fraca, de $\pm 0,5$ a $\pm 0,7$ moderada, de $\pm 0,7$ a $\pm 0,9$ correlação forte e maior que $\pm 0,9$ muito forte (MUKAKA, 2012). Da mesma forma, realizou-se análise uni e multivariada (R^2) considerando a concentração como variável dependente e os fatores climáticos como variáveis independentes.

3.8 FOMENTOS E INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

As coletas de material foram realizadas em impactador e filtros gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Ricardo Moreton Godoi (Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Paraná - UFPR).

Para a extração do material dos filtros e respectivas análises por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), contamos com a parceria do laboratório de Alergologia e Imunologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). A pesquisadora pôde trabalhar presencialmente neste local sob supervisão do Prof. Dr Ernesto Taketomi e sua equipe de laboratório. Os kits para realização do ELISA para Cyn d 1 e Gly m1 foram gentilmente fornecidos pela ALK-Abello® (Madri - Espanha), empresa especializada em produtos na área de alergia e imunologia.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DOS FILTROS AMOSTRADOS

Foram coletados 70 filtros, durante o período de 12 meses (29 de março de 2017 a 26 de março de 2018). O tempo de duração das coletas foram padronizadas em 1 ou 2 dias, com média de 24 horas e 6 minutos ou 48 horas e 20 minutos, respectivamente. O volume de ar amostrado em cada filtro foi, em média, 1,13 m³ de ar por hora. Todos os meses tiveram filtros coletados, com a média e mediana de intervalo entre as coletas de 5 dias (variando de 1 a 14 dias). Do total de filtros, 10 deles foram excluídos da análise conforme os critérios de exclusão previamente estabelecidos (seção 3.3).

Na Tabela 1 são apresentados o número de filtros coletados em cada mês, separados de acordo com o tempo de duração da coleta (24 ou 48 horas) e os filtros excluídos.

TABELA 1 – DADOS DOS FILTROS COLETADOS			
MÊS/ANO	Duração 24h	Duração 48h	Excluídos
Março/17	2	0	
Abril/17	4	3	1
Maio/17	4	3	
Junho/17	2	4	
Julho/17	4	3	
Agosto/17	3	2	2
Setembro/17	2	2	
Outubro/17	2	3	
Novembro/17	4	5	
Dezembro/17	2	2	4
Janeiro/18	2	4	
Fevereiro/18	2	2	3
Março/18	2	2	
Total	35	35	10

FONTE: A autora (2020)

Foram analisados 28 filtros de 24 horas e 32 filtros de 48 horas totalizando 60 amostras.

4.2 ANÁLISE DOS DADOS METEOROLÓGICOS

4.2.1 TEMPERATURAS MÁXIMA, MÍNIMA E MÉDIA COMPENSADA E UMIDADE RELATIVA DO AR (UR)

As temperaturas máxima e mínima são aferidas por termômetro especiais, em graus Celsius (°C), coletadas às 12h e às 24h. A média compensada, é calculada a partir da fórmula:

$$T_{\text{MÉDIA COMP}} = (T_{\text{MÁX}} + T_{\text{MÍN}} + T_{12\text{H}} + 2 T_{24\text{H}}) / 5$$

A média das temperaturas máximas encontrada no período analisado (avaliação diária anual) foi de 28,6 °C, enquanto a média das mínimas foi de 18,8 °C. Considerando apenas os dias amostrados, a média das temperaturas máximas foi de 28,7 °C, a média das temperaturas mínimas foi de 17,6 °C com média compensada de 22,4 °C.

Os dados referentes à umidade relativa do ar, são coletados nos 3 horários (12h, 18h e 24h) e fornecidos em percentual (%). Destes dados, retira-se o valor da UR diária, que trata-se, também, de uma média compensada:

$$UR = (UR_{12\text{H}} + UR_{18\text{H}} + 2 UR_{24\text{H}}) / 4$$

A média da UR encontrada no período analisado foi 68,5%, enquanto a média da UR encontrada considerando apenas nos dias de coleta foi de 65,6%.

4.2.2 PRECIPITAÇÃO E INSOLAÇÃO

Os valores diários da precipitação e insolação são computados como valores acumulados ao longo do dia. A precipitação é dada na unidade de milímetros (mm) e a insolação em horas.

Durante os 12 meses estudados, a média de precipitação foi 5,64 mm (sendo que em 67,4% dos dias a precipitação foi nula).

Considerando apenas os dias de filtros amostrados, a média de precipitação foi de 7,09 mm (sendo que em 60% dos dias não houve precipitação).

A insolação considera o número de horas que o sol é visível para um observador na superfície terrestre com o horizonte desobstruído. No presente levantamento, considerando todo o período analisado, a média de insolação foi de 7,13 horas. Ao considerarmos apenas os dias em que os filtros foram coletados, esse valor passa a ser de 7,7 horas.

4.2.3 VENTO

A intensidade do vento é aferida nos 3 horários (12h, 18h e 24h) e seu valor diário é calculado através de uma média aritmética simples. A unidade de medida foi em m/s (metros por segundo).

Segundo a classificação de intensidade dos ventos pela escala de Beaufort os valores são assim classificados: menor 0,3 m/s (vento calmo), 0,3 a 1,5 m/s (aragem), 1,6 a 3,3 m/s (brisa leve) e 3,4 a 5,4 (brisa fraca). Na coleta de dados diários neste período de 12 meses do estudo, a intensidade do vento oscilou de 0 a 5 m/s com média de 1,31 m/s.

Considerando apenas os dias amostrados, a intensidade do vento oscilou de 0,33 a 4 m/s com média de 1,48 m/s.

A direção do vento é obtida em graus, em sentido horário a partir do norte geográfico verdadeiro, também medida nos 3 horários (12h, 18h e 24h). O registro de dados do INMET utiliza uma mensagem sinótica para a direção, conforme Tabela 2.

TABELA 2 - DIREÇÃO DO VENTO E MENSAGEM SINÓTICA

DIREÇÃO DO VENTO	INDICAÇÃO DA GRIMPA (Cata Vento de WILD)	Mensagem sinótica
Nordeste	NE	05
Leste	E	09
Sudeste	SE	14
Sul	S	18
Sudoeste	SW	23
Oeste	W	27
Noroeste	NW	32
Norte	N	36
Calmo	C (Qualquer)	00

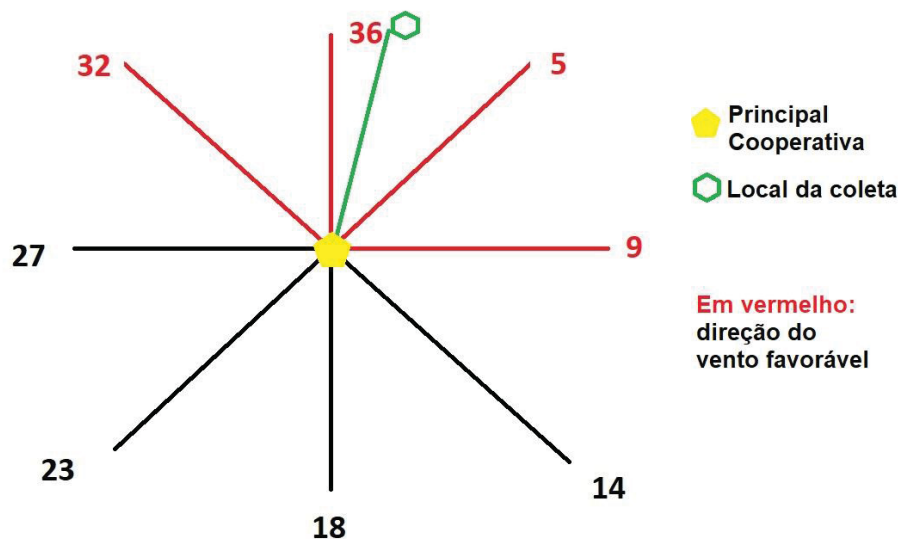
FONTE: A autora (2020)

NOTA: NE=Nordeste; E= Leste; SE= Sudeste; S=Sul; SW=Sudoeste; W= Oeste; NW=Noroeste; N=Norte; C= Calmo

Para considerar a direção do vento nas coletas de 24 horas observamos as marcações dos 3 horários, e para as de 48h, as 6 aferições. Destas aferições foi considerado a de maior predomínio como a direção do vento no período analisado. Considerando todo o período de análise houve predomínio de vento leste e nordeste em 50,8%. Se forem considerados apenas os dias de coleta, houve predomínio de vento leste e nordeste em 56,8% (34/60) das amostras. Ao analisarmos a localização

do ponto de coleta dos filtros em relação à cooperativa, este se encontra entre o norte e nordeste da mesma (pontos 36 e 5). Ampliando um pouco o raio centrando no local de coleta e na cooperativa, temos como vento favorável aqueles que estão entre os pontos sinóticos de 32, 36, 5, 9 (FIGURA 11).

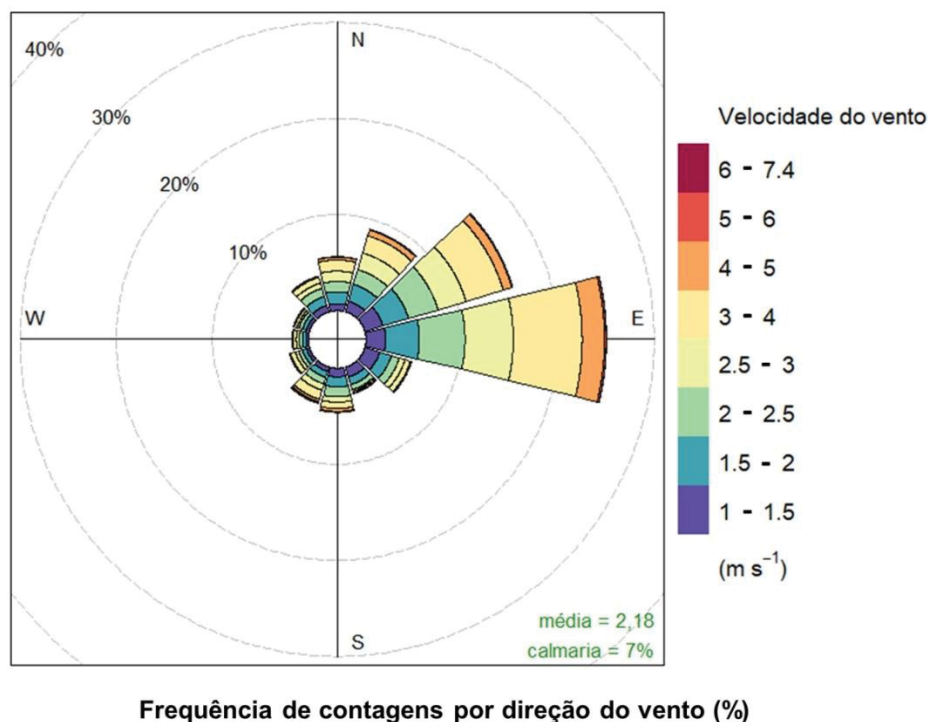
FIGURA 11 – DIREÇÃO DOS VENTOS DE ACORDO COM A LOCALIZAÇÃO DA COOPERATIVA DE SOJA E O LOCAL DE COLETA.



FONTE: A autora (2020)

NOTA: 36= Norte; 5= Nordeste; 9= Leste; 14= Sudeste; 18=Sul; 23=Sudoeste; 27= Oeste; 32=Noroeste.

FIGURA 12 – ROSA DOS VENTOS DE ACORDO COM O PREDOMÍNIO DE DIREÇÃO E INTENSIDADE DOS VENTOS REFERENTE AOS DIAS DE COLETA.



FONTE: SILVA, J.; GODOI, R.H.M. (2020)

Desta forma, dos 60 filtros analisados, 43 deles foram encontrados entre os eixos vermelhos da Figura 11, de 32 a 36, 36 a 5, e 5 a 9, sendo o eixo verde correspondente à coordenada entre a cooperativa e o local da coleta.

Para fins de análise estatística deste dado (correlação e regressão uni e multivariada), utilizamos o método estatístico direcional que permite calcular através de um algoritmo, a direção do vento obtido de vários dados, transformando-o em um dado único.

Os dados meteorológicos diários dos 365 dias do ano estudado, ou seja, de Março de 2017 a Março de 2018, foi comparado com os encontrados apenas nos dias amostrados por filtros, sendo evidenciada homogeneidade entre eles, com exceção da temperatura mínima que apresentou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,013$, IC 95%, pelo teste t student).

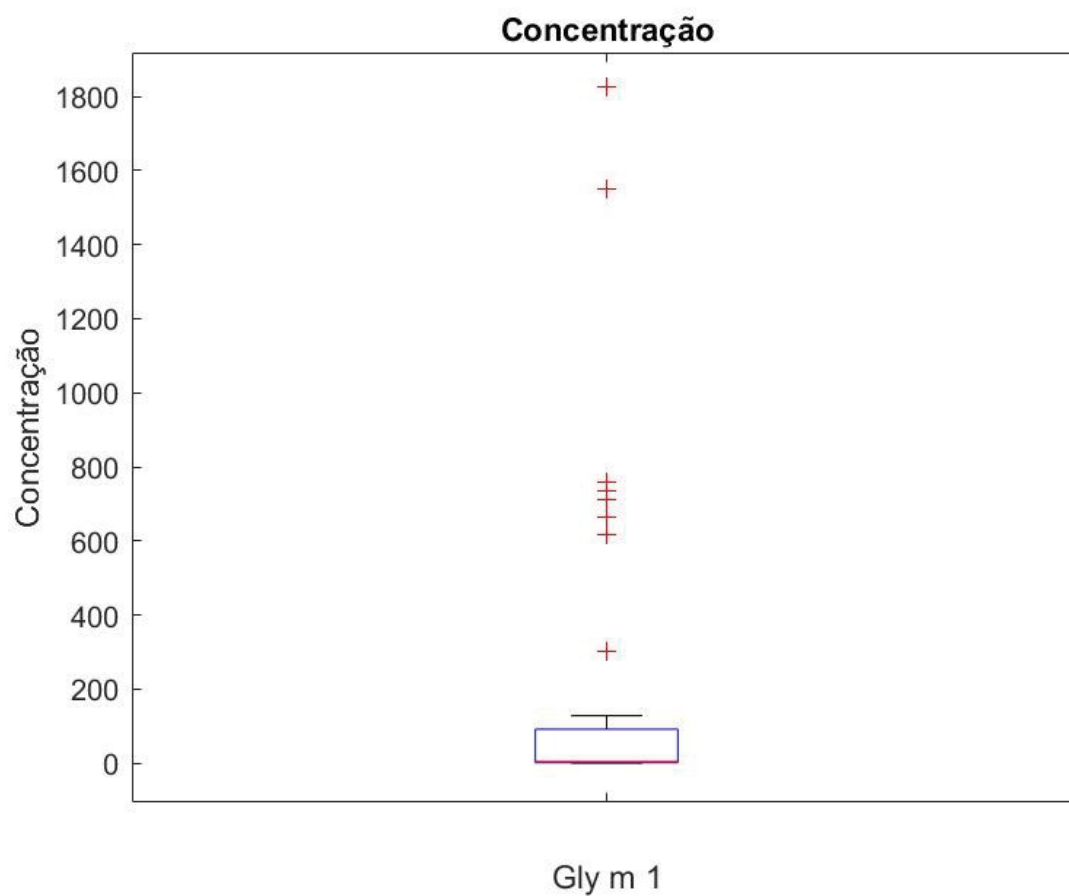
4.3 CONCENTRAÇÕES DE GLY M 1

As concentrações de Gly m 1 por ELISA (ng/mL) foram convertidas para ng do alérgeno por m^3 de ar por ser esta a unidade de medida mais utilizada. A mediana encontrada foi de 4,89 ng/ m^3 . Todas as amostras apresentaram a presença de Gly m 1, sendo o menor valor encontrado de 0,67 ng/ m^3 e a maior concentração de 1826,1 ng/ m^3 .

Quando separados em dois grupos, os filtros de 24 horas apresentaram mediana de concentração de 4,4 ng/ m^3 , enquanto que 32 filtros de 48 horas apresentaram mediana de concentração de 6,3 ng/ m^3 . Contudo, quando comparadas as concentrações de Gly m 1 do grupo 24 horas com o grupo 48 horas, não houve diferenças significativas entre os grupos (análise de Mann Whitney; $p = 0,32$), sendo portanto, similares. Da mesma forma, quando feita a análise dos dois grupos, excluindo os valores *outliers* (total de 8 amostras com concentrações superiores a 225 ng/ m^3), o grupo de 24 horas (25 filtros) apresentou mediana de 4,03 ng/ m^3 e o de 48 horas (27 filtros) apresentou mediana de 3,09 ng/ m^3 evidenciando novamente a homogeneidade entre os grupos (análise de Mann Whitney; $p = 0,157$).

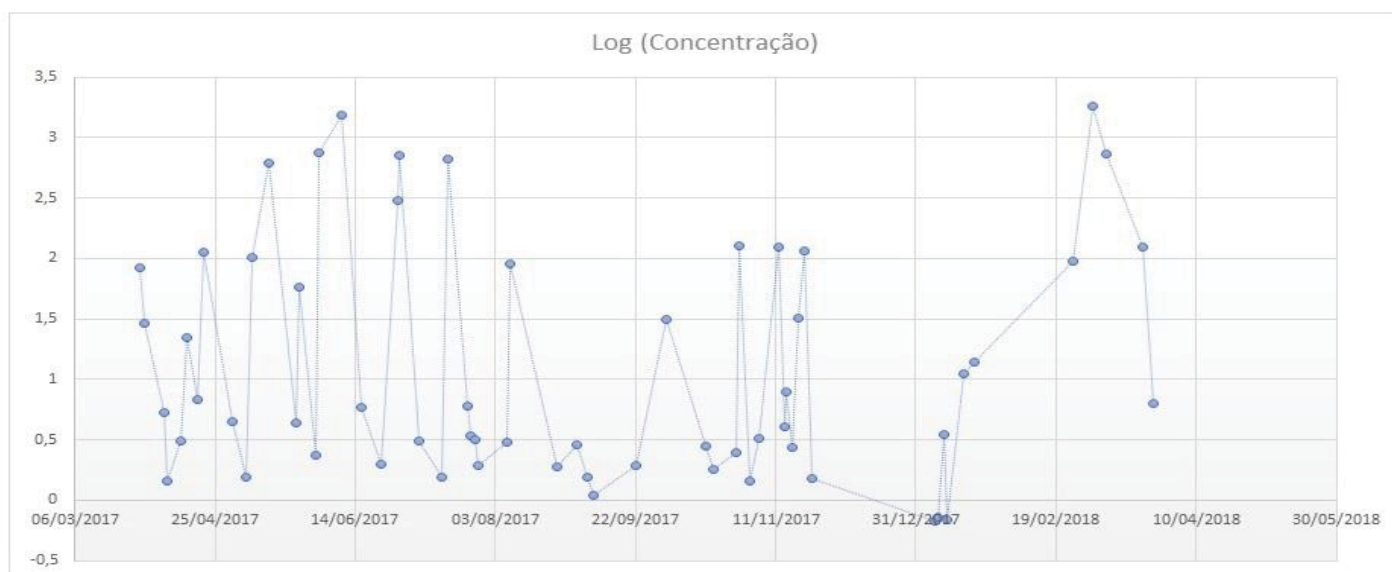
A FIGURA 12 mostra os gráficos das concentrações de Gly m 1 encontradas nas 60 amostras em escala logarítmica em base 10.

FIGURA 13- DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE GLY M 1 EM BOX PLOT, EVIDENCIANDO OS OUTLIERS.



FONTE: A autora (2020)

FIGURA 14- CONCENTRAÇÕES DE GLY M 1 EM ESCALA LOGARÍTIMICA (LOG NA BASE 10) NAS 60 AMOSTRAS.



FONTE: A autora (2020)

A TABELA 3 mostra os dados climáticos dos dias de coletas e as concentrações encontradas.

TABELA 3 – DADOS CLIMÁTICOS E CONCENTRAÇÃO DE GLY M 1 DOS FILTROS AMOSTRADOS (N=60)

Mês	Data ¹	Nº de dias ²	T Méd (°C)*	UR ³ (%)*	IV ⁴ (m/s)*	Direção do vento ⁵	Insolação (horas)*	Gly m 1 (ng/m ³)
mar/17	29/03/17	1	23,2	61,50	1,67	E	10,9	84
	31/03/17	1	23,3	54,25	1,67	SE	10,0	29
	07/04/17	1	23,5	83,50	1,67	E	1,7	5,4
	08/04/17	2	24,7	76,63	1,50	E	5,4	1,4
abr/17	13/04/17	2	23,7	66,38	1,33	E	10,1	3,1
	15/04/17	1	25,6	60,25	1,33	E	10,5	22
	19/04/17	2	21,4	75,13	1,33	NE	5,5	6,8
	21/04/17	1	19,1	85,00	1,00	NW	3,5	112
mai/17	01/05/17	1	19,9	82,75	2,00	E	5,0	4,4
	06/05/17	2	20,7	75,88	1,33	N	9,7	1,6
	08/05/17	1	20,4	68,50	1,00	NE	10,2	103
	14/05/17	2	20,6	78,25	1,17	O	7,1	615
	24/05/17	1	22,5	72,25	1,33	NE	9,6	4,4
	25/05/17	2	24,4	73,13	1,33	NE	9,7	58
	31/05/17	1	17,6	90,50	1,33	W	1,7	2,3
	01/06/17	2	14,0	80,13	1,33	S	7,8	759
jun/17	09/06/17	1	11,9	65,50	4,00	SW	0,7	1549
	16/06/17	2	20,3	70,88	1,50	NE	9,9	5,9
	23/06/17	2	19,9	68,88	1,83	E	9,9	1,9
	29/06/17	1	21,2	66,50	0,67	NE	5,4	303
	30/06/17	2	20,7	67,50	0,33	S	7,3	709
	07/07/17	1	18,7	62,25	2,33	E	9,9	3,1
jul/17	15/07/17	2	21,5	46,50	2,00	N	10,1	1,6
	17/07/17	1	12,0	80,75	4,00	SW	1,4	666
	24/07/17	1	21,6	40,50	2,33	NE	9,9	6,0
	25/07/17	2	21,6	46,63	1,17	E	10,0	3,4
	27/07/17	1	20,5	54,50	1,33	E	10,0	3,2
	28/07/17	2	20,1	54,50	2,33	E	10,0	1,9
ago/17	07/08/17	1	20,3	49,25	1,67	NE	10,1	3,0
	08/08/17	2	24,1	49,50	1,00	NW	7,7	90
	25/08/17	2	23,0	48,63	1,83	E	10,8	1,9
	01/09/17	1	22,6	55,50	3,67	E	10,4	2,9
set/17	05/09/17	2	24,9	34,13	1,50	NE	10,6	1,6
	07/09/17	2	26,1	32,00	1,67	E	10,1	1,1
	22/09/17	1	27,6	36,75	0,67	NW	10,6	2,0
out/17	03/10/17	2	19,3	42,38	1,33	E	10,4	31
	17/10/17	2	28,0	48,38	1,67	NE	11,4	2,8

nov/17	20/10/17	1	23,2	70,75	1,33	NE	0,3	1,8
	28/10/17	1	22,4	82,50	0,67	NW	7,2	2,5
	29/10/17	2	22,4	84,13	1,00	O	3,7	128
	02/11/17	2	23,4	62,00	2,50	E	10,0	1,4
	05/11/17	1	21,8	89,50	0,33	S	1,1	3,3
	12/11/17	2	23,8	36,75	1,17	S	12,2	124
	14/11/17	1	25,5	30,75	1,33	E	12,1	4,0
	15/11/17	2	27,3	50,13	1,17	N	11,2	7,9
	17/11/17	1	25,4	65,50	1,00	N	9,5	2,8
	19/11/17	2	24,4	68,25	1,33	E	10,4	32
	21/11/17	1	23,5	74,25	1,33	O	7,6	114
	24/11/17	2	25,3	61,25	1,67	N	7,7	1,5
	07/01/18	1	23,5	79,00	1,33	E	10,0	0,67
	08/01/18	2	21,4	86,25	1,83	E	2,3	0,73
jan/18	10/01/18	1	22,5	88,25	1,00	SW	1,4	3,5
	11/01/18	2	23,4	88,13	0,83	W	3,3	0,68
	17/01/18	2	24,1	84,63	1,17	O	2,1	11
fev/18	21/01/18	2	26,6	68,00	0,83	E	7,2	14
	25/02/18	2	25,7	58,38	0,50	E	7,4	94
	04/03/18	2	26,8	64,75	1,17	W	10,4	1826
mar/18	09/03/18	2	24,8	78,38	1,17	O	8,5	733
	22/03/18	1	24,8	76,25	1,33	E	5,3	124
	26/03/18	1	22,9	85,00	1,67	O	4,3	6,4

NOTA: * Valores médios encontrados durante o intervalo de duração das coletas das amostras.

Data¹: dia do início da coleta

Nº de dias²: Tempo de duração de cada coleta (1= 24h e 2= 48h)

UR³: Umidade relativa do ar

IV⁴: intensidade do vento

Direção do vento⁵: N (Norte); NE (Nordeste); E (leste); S (Sul); SE (Sudeste); SW (Sudoeste); W (Oeste); NW (Noroeste); O (Calmo).

FONTE: A autora (2020)

As correlações entre as variáveis meteorológicas e as concentrações de Gly m 1 em ng/m³, foram fracas. Da mesma forma, utilizando-se de modelos de regressão linear univariada e multivariada, cuja variável dependente é a concentração de Gly m 1 (ng/m³), e os fatores climáticos, variáveis independentes, os modelos não se ajustaram adequadamente aos dados (TABELA 4).

Foram realizadas as transformações dos dados da concentração de Gly m 1 para escala logarítmica base 10, raiz quadrada, raiz cúbica e inversa para posterior análise de correlações e regressões.

TABELA 4 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (R) E DETERMINAÇÃO (R²) ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE GLY M 1 (NG/M³) E DADOS METEREOLÓGICOS

	CONCENTRAÇÃO Gly m 1 (ng/m ³)		
	R	R ²	P
Temperatura Máxima	0,33	0,11	0,008
Temperatura Mínima	0,33	0,11	0,011
Temperatura Média	0,33	0,11	0,01
Umidade Relativa	0,39	0,15	0,002
Precipitação	0,27	0,07	0,034
Insolação	0,29	0,08	0,024
Intensidade do vento	0,42	0,18	0,001
Direção do vento	0,21	0,05	0,1
Multivariada*	0,51	0,26	NS**

FONTE: A autora (2020)

NOTA: * com todas variáveis climáticas

**NS= não significativo

Com os dados das concentrações de Gly m 1 convertidas em escala logarítmica base 10 e em raiz cúbica, foi possível verificar valores de correlações positivas fortes para as temperaturas (mínima, média e máxima), bem como para UR. Nas análises de regressão univariada e multivariada, cuja a variável dependente foi a concentração de Gly m 1 (em Log₁₀ ou Raiz cúbica) e as variáveis independentes foram os fatores climáticos, não houve variáveis com poder de discriminação significativo (TABELA 5).

TABELA 5 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (R) E DETERMINAÇÃO (R²) ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE GLY M 1 (LOG10 E RAIZ CÚBICA) E DADOS METEREOLÓGICOS

	CONCENTRAÇÃO Gly m 1 (LOG 10)			CONCENTRAÇÃO Gly m 1 (RAIZ CÚBICA)		
	R	R ²	p	R	R ²	P
Temperatura Máxima	0,73	0,53	<0,001	0,72	0,51	<0,001
Temperatura Mínima	0,71	0,5	<0,001	0,7	0,49	<0,001
Temperatura Média	0,72	0,51	<0,001	0,71	0,5	<0,001
Umidade Relativa	0,75	0,56	<0,001	0,75	0,56	<0,001
Precipitação	0,37	0,14	0,003	0,4	0,16	0,001
Insolação	0,66	0,43	<0,001	0,64	0,41	<0,001

Intensidade do vento	0,67	0,45	<0,001	0,69	0,48	<0,001
Direção do vento	0,32	0,10	0,012	0,32	0,10	0,012
Multivariada*	0,79	0,63	NS**	0,79	0,62	NS**

FONTE: A autora (2020)

NOTA: * com todas variáveis climáticas; **NS=não significativo

Foram feitas as mesmas análises estatísticas excluindo-se as amostras com valores extremos (outliers). Pelo cálculo de outliers, utilizando como valores o primeiro quartil de 2,24 e o terceiro quartil 91,4, os outliers foram todos os valores acima de 225,2, totalizando 52 amostras. Os dados encontram-se na Tabela 6.

TABELA 6 - COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (R) E DETERMINAÇÃO (R²) ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE GLY m 1 (SEM OUTLIERS) E DADOS METEOROLÓGICOS

	CONCENTRAÇÃO Gly m 1 (ng/m ³)			CONCENTRAÇÃO Gly m 1 (LOG 10)			CONCENTRAÇÃO Gly m 1 (RAIZ CÚBICA)		
	R	R ²	p	R	R ²	p	R	R ²	p
Temperatura Máxima	0,53	0,3	<0,001	0,77	0,59	<0,001	0,86	0,73	<0,001
Temperatura Mínima	0,52	0,27	<0,001	0,76	0,57	<0,001	0,85	0,72	<0,001
Temperatura Média	0,52	0,27	<0,001	0,76	0,58	<0,001	0,85	0,73	<0,001
Umidade Relativa	0,52	0,27	<0,001	0,74	0,55	<0,001	0,83	0,69	<0,001
Precipitação	0,29	0,08	0,038	0,29	0,08	0,038	0,36	0,13	0,008
Insolação	0,48	0,23	<0,001	0,71	0,51	<0,001	0,79	0,62	<0,001
Intensidade do vento (IV)	0,4	0,16	0,003	0,65	0,42	<0,001	0,74	0,55	<0,001
Direção do vento	0,12	0,01	0,407	0,22	0,05	0,11	0,28	0,08	0,045
Multivariada*	0,63	0,4	0,018 para IV**	0,82	0,67	0,008 para IV**	0,89	0,78	0,010 para IV**

FONTE: A autora (2020)

NOTA: *com todas variáveis climáticas; ** IV=intensidade do vento

Com a exclusão dos *outliers*, todas as análises apresentaram-se com resultados melhores. Particularmente, foram encontradas correlações positivas mais fortes das concentrações de Gly m 1 (em raiz cúbica) com os fatores climáticos:

temperaturas (máxima, média e mínima), UR, insolação e intensidade do vento. Da mesma forma, na análise de regressão linear univariada as temperaturas (máxima, média e mínima) e umidade relativa apresentaram valores de R^2 próximos de 70%. Na análise multivariada, apenas a intensidade do vento mostrou-se como poder discriminativo ($p < 0,001$).

Os dados da regressão linear simples geraram as seguintes equações para as temperaturas e UR:

$$\text{Gly m 1 (raiz cúbica)} = 0,0728 \times T \text{ máx } (^\circ\text{C}), R^2 = 73\%, p < 0,001$$

$$\text{Gly m 1 (raiz cúbica)} = 0,1168 \times T \text{ min } (^\circ\text{C}), R^2 = 72\%, p < 0,001$$

$$\text{Gly m 1 (raiz cúbica)} = 0,0925 \times T \text{ méd } (^\circ\text{C}), R^2 = 73\%, p < 0,001$$

$$\text{Gly m 1 (raiz cúbica)} = 0,0312 \times \text{UR } (\%), R^2 = 69\%, p < 0,001$$

Os gráficos das concentrações de Gly m 1 (em raiz cúbica) com as temperaturas e UR estão representados nos APÊNDICES 1, 2, 3, e 4. A Equação (1) apresenta a função utilizada para padronizar os valores de todas as variáveis em uma mesma escala para a construção dos gráficos:

$$x_{std}^{(i)} = \frac{\sqrt{(x^{(i)} - \mu_x)^2}}{\sigma_x}, \quad (1)$$

onde μ_x é a média dos valores de x e σ_x é o desvio padrão dos valores de x .

Os dados completos das concentrações, correlações e regressões com Gly m 1 em ng/m^3 , Log_{10} , raiz cúbica, raiz quadrada e inversa encontram-se nos APÊNDICES 5 e 6.

5 DISCUSSÃO

O impacto alergênico da poeira de soja, e em particular de seu alérgeno principal, Gly m 1, ainda é pouco explorado. Houve um período de estudos mais intensos sobre o tema com foco na asma epidêmica nas cidades portuárias da Europa (ANTO et al, 1989; NAVARRO et al, 1993; ANTO; SUNYER; NEWMAN, 1996; CODINA et al, 1997; CRUZ et al, 2000; GONZALEZ et al, 2000; ANTONICELLI et al, 2010). Contudo, não existem dados de avaliações recentes e nem tão pouco estudos que abordem a exposição ao alérgeno em cidades agroindustriais, como Maringá/PR.

O alérgeno da poeira de soja é capaz de causar sintomas respiratórios comprovados por broncoprovocações (ZAPATERO et al., 1994; MAGGIO et al., 2003). Contudo, o real impacto da presença do Gly m 1 na atmosfera segue incógnito. Baseado nos dados dos surtos ocorridos em Barcelona na década de 90, acredita-se que a alergenicidade à poeira de soja ocorra em 1 a cada 1700 pessoas (ACEVES et al., 1991). Sabidamente, fatores climáticos e particularidades da população interferem nesta sensibilização e certamente na apresentação de sintomas (ANTO; SUNYER; NEWMAN, 1996; SORIANO et al., 1997; ANTONICELLI et al., 2010). Ademais, a alergenicidade da casca de soja pode ser afetada pelo aquecimento durante o armazenamento e transporte do grão o que pode produzir novos determinantes de alérgenos ou aumentar a exposição aos epítomos por mudanças conformacionais (CODINA et al., 1998).

Existe um desconhecimento sobre o perfil de sensibilização alérgica da população ao Gly m 1. O ImmunoCAP ISAC®, que avalia a sensibilização por componentes alergênicos, não contempla o Gly m 1, apenas Gly m 4, Gly m 5 e Gly m 6. Além disso, não há disponibilidade de ELISA para Gly m 1 comercialmente. Poucos estudos avaliaram a sensibilização por ELISA nas populações portuárias e foram importantes para correlação do alérgeno com os surtos de asma (RODRIGO et al., 1990; GONZALEZ et al., 1991; GONZALEZ et al., 1992; MORELL et al., 1994).

Codina et al. (2000) e Pendino et al. (2011) avaliaram a sensibilização por teste de puntura ao extrato de casca da soja em adultos e crianças, respectivamente, com asma. Ambos evidenciaram sensibilização a casca de soja mesmo em populações sem exposição direta ao grão. Contudo todos os testados foram polissensibilizados, apresentando reatividade também a ácaros, fungos ou polens.

Codina et al (2000), observou maior gravidade e dependência de corticoterapia em asmáticos sensibilizados à casca da soja. Mesmo em testes de sensibilização para extratos da casca da soja, uma outra proteína da soja, de alto peso molecular (50 KDa), também já foi descrita como potencial sensibilizante (CODINA et al., 2002).

Os demais estudos que avaliaram sensibilização, por testes de puntura ou IgE sérica específica para soja, apesar da alta sensibilidade, tratam-se de sensibilização total à soja e não possuem a especificidade da análise por componente que permite diferenciar se a sensibilização é por alérgeno alimentar ou inalatório (SUNYER et al., 1989; NAVARRO et al., 1993; MAGGIO et al., 2003). Como visto com outros alérgenos, as concentrações de cada proteína nos extratos de soja também são muito divergentes a depender das fontes de extração e laboratórios de produção (HERIAN et al., 1992; WHO, 1998). Harris-Robert et al. (2012) identificaram IgE específica para soja total em 14% dos trabalhadores de diversos setores da indústria deste grão. Dentre eles, os indivíduos atópicos apresentaram 35 vezes mais chances de serem sensibilizados a soja. Dentre os sensibilizados, a chance de desenvolver rinite ocupacional foi quase três vezes maior. O maior risco de desenvolver tosse e dispneia foi do grupo de trabalhadores que atuavam diretamente descarregando os grãos não processados.

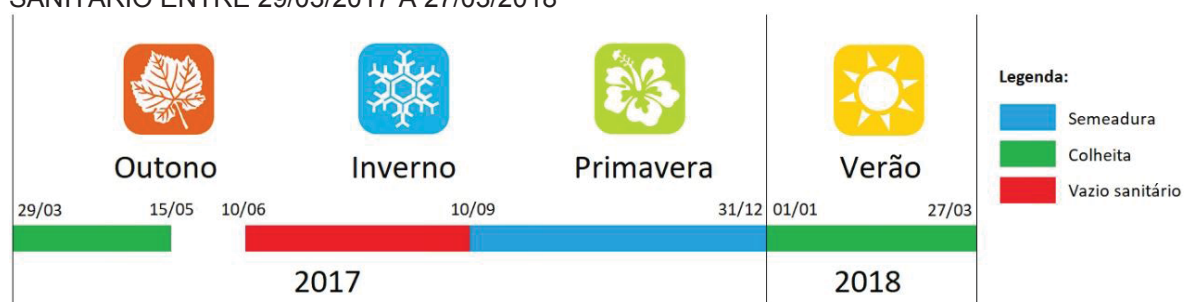
No Brasil, Pinto et al. (2007) identificaram que indivíduos sintomáticos que habitavam a zona rural em meio a cinturões de soja apresentaram 28% de sensibilização ao grão, por teste cutâneo com extrato total, sendo que 5% deles foram monossensibilizados à soja. Da mesma forma, entre moradores da região fabril e caminhoneiros que transportavam soja, a sensibilização foi elevada (22% para ambos os grupos), mas não exclusiva, ocorrendo também aos ácaros de estocagem e aos fungos que colonizam os grãos. Observação entre 40 crianças asmáticas em Maringá (THOM DE SOUZA 2020b) mostrou que 16 delas apresentaram teste cutâneo positivo para extrato de soja total. As mesmas 16 apresentaram teste positivo para *D. pteronyssinus* e 13 para *Blomia tropicalis*, ambos ácaros (extratos IPI-ASAC®). Nota-se portanto, que há um grupo de indivíduos atópicos, polissensibilizados, e a soja pode ser um sensibilizante adicional neste contexto, em que os ácaros e fungos exercem o papel principal, como protagonistas das manifestações respiratórias alérgicas.

Embora a sensibilização a soja seja mais corriqueira entre aqueles que trabalham diretamente com grãos ou residem nas proximidades, uma característica

dos surtos de asma relatados nas cidades portuárias é que os estivadores não apresentavam maior predomínio de sintomas que a população da região. Isso é atribuído ao fato da poeira de soja ser formada por partículas muito finas que se dispersam no ar facilmente por sua leveza. O que também explica a ausência de sintomas nasais durante os surtos asmáticos das cidades portuárias, já que a partícula se depositava predominantemente em vias aéreas de pequeno calibre (PICADO, 1992).

Apesar disso, os níveis de Gly m 1 detectados na atmosfera mostram-se mais elevados nas proximidades dos locais de manuseio da soja. Dosagens realizadas na área portuária foram 12 vezes mais elevadas que a 5 km de distância do porto (ANTONICELLI et al., 2010). No presente estudo, o ponto de coleta estava a uma distância intermediária da cooperativa (cerca de 2 km). Apesar de relativa distância, evidenciamos níveis de Gly m 1 detectáveis em todas as amostras coletadas durante os 12 meses. Poeira da casca de soja também pode ser produzida durante os períodos de colheita e em todas as fases de beneficiamento da soja (GIJZEN et al., 2003; ANTONICELLI et al., 2010; HARRIS-ROBERTS et al., 2012), o que justifica a presença perene do Gly m 1 na atmosfera de Maringá e não somente sazonal. Apesar da colheita ocorrer entre janeiro e março (FIGURA 13), a cooperativa trabalha no beneficiamento de grãos durante o ano todo. Segundo Villalbi et al. (2004), o descarregamento e processamento de soja geram dispersão alergênica atmosférica similar.

FIGURA 15- REPRESENTAÇÃO DOS PERÍODOS DE SEMEADURA, COLHEITA E VAZIO SANITÁRIO ENTRE 29/03/2017 A 27/03/2018



FONTE: A autora (2020) – dados coletados da ADAPAR (Agência de Defesa Agropecuária do Paraná) 2016/ 2017.

No presente estudo, identificamos algumas correlações positivas fortes quando tratados os dados de concentração para log base 10 ou raiz cúbica. A

escolha por realizar essas transformações dos dados, se deve a grande dispersão de valores encontrados (de 0,67 ng/m³ a 1826,1 ng/m³). Análises de correlação e regressão são influenciadas com a presença de valores extremos e a transformação dos dados pode reduzir o efeito deste viés. As correlações foram maiores quando retirados os *outliers*. Observamos correlação positiva forte das concentrações de Gly m 1 (em raiz cúbica) com as temperaturas ($R \geq 85\%$), umidade relativa ($R = 83\%$), insolação ($R = 79\%$) e intensidade do vento ($R = 74\%$). Nos modelos de regressão linear univariada utilizando novamente as concentrações tratadas em raiz cúbica obtivemos $R^2 > 70\%$ para as temperaturas e $R^2 = 69\%$ para umidade relativa. De forma similar, na avaliação realizada em Ancona, Antonicelli et al. (2010) observaram no modelo de regressão linear multivariada que as concentrações de Gly m 1 sofreram influências dos fatores temperatura e umidade relativa do ar.

Outros estudos de análises de concentrações de Gly m 1, evidenciaram que alta pressão atmosférica, ventos calmos e a direção do vento foram fatores possivelmente associados a maior dispersão do alérgeno (CAROLL, 1968; ANTO et al, 1989; VILLALBI et al., 2004). No presente estudo, houve correlação positiva forte da intensidade do vento com as concentrações. Contudo, durante todos os dias analisados, a intensidade do vento foi considerada calma, variando de aragem a brisa leve. Isto pode ter sido um fator de contribuição para a dispersão constante do alérgeno. Quanto à direção do vento, não evidenciamos correlação com as concentrações, contudo houve predomínio de ventos favoravelmente da cooperativa para o ponto de coleta, o que pode ter favorecido a presença diária de níveis detectáveis do Gly m 1 (HEEDERIK et al., 2014).

Embora haja controvérsia acerca dos valores de Gly m 1 capazes de desencadear sintomas, no presente estudo, identificamos alguns valores considerados elevados. Das 60 amostras analisadas, em 14 (23%) foram encontrados valores maiores que 90 ng/m³, com pico de 1826 ng/m³ no mês de março de 2018. Destaca-se que em quase todos os meses encontramos ao menos 1 dosagem superior a 90 ng/m³, com exceção dos meses de setembro 2017 e janeiro 2018, cujas concentrações mensais foram as mais baixas variando de 1,09 – 2,85 ng/m³ e 0,66-13,9 ng/m³, respectivamente. Em contrapartida, nos meses de junho 2017 e março de 2018 foram detectados os maiores níveis de Gly m 1. Em junho 2017 os valores variaram de 1,98 a 1549 ng/m³ (mediana 303,44 ng/m³) e março 2018 de 6,35 a 1826 ng/m³ (mediana de 428 ng/m³).

Os altos níveis encontrados em particular nos meses de junho 2017 e março de 2018 podem ser relacionados com a elevada umidade relativa encontrada naqueles meses ($> 70\%$), muito embora outros meses também tenham apresentado valores de UR elevados. Inclusive, o mês de janeiro, no qual ocorreram baixas concentrações do alérgeno, apresentou elevada UR. Todavia os baixos níveis encontrados em janeiro podem ser atribuídos a precipitação, que foi intensa neste mês, com média de 21 mm nos dias de coleta, como visto em outros estudos (GIJZEN et al., 2003). Outro fator que pode ter contribuído para os valores mais elevados em março de 2018 é a coincidência com o período de colheita da soja. Gijzen et al. (2003) também observaram que os picos dos níveis de Gly m 1 se deram durante o mês de colheita (atingindo 73 ng/m^3). A presença de campos de cultivo nas proximidades, bem como a forma de colheita realizada pode influenciar nos níveis encontrados.

Muitas questões seguem sem respostas. A sensibilização à soja encontrada em nossa população (THOM DE SOUZA et al, 2020b) se deve também ao Gly m 1, ou ocorre predominantemente pela via alimentar? Estes indivíduos sensibilizados a soja apresentam risco de apresentar sintomas com as concentrações encontradas no ar atmosférico de Maringá? É provável que sim. Embora os picos de Gly m 1 encontrados nas epidemias de asma fossem elevados ($> 700 \text{ ng/m}^3$), acredita-se que indivíduos sensibilizados a soja e previamente asmáticos possam apresentar sintomas em concentrações bem mais baixas (GILZEN et al., 2003; VILLALBI et al., 2004). Possivelmente outros fatores ajam de forma sinérgica aos níveis de Gly m 1 encontrados, desde polissensibilização a ácaros e fungos, fatores climáticos, poluição e predisposições genéticas individuais. Desta forma, vale a reflexão, bem como estudos populacionais, de quais seriam, de fato, níveis baixos ou altos de Gly m 1 para a população de Maringá e outras localidades do Brasil.

As legislações que se aplicam a agroindústria tratam de resíduos e poeiras de modo geral, contudo, a poeira da soja, precisaria ser vista de forma específica por ser um resíduo com potencial alergênico. Não há regulamentação ambiental no país quanto a poeira da soja apesar de ser um produto frequentemente produzido e beneficiado no Brasil.

Algumas limitações devem ser pontuadas neste estudo. As coletas foram realizadas em um único local da cidade e refletem apenas aquele ponto. A altura de coleta foi a apenas 90 cm do solo, o que poderia influenciar negativamente a

amostragem devido a anteparos próximos. Os dias de coleta foram escolhidos por conveniência. Dias muito chuvosos eram automaticamente descartados pela impossibilidade de expor o aparelho a chuvas mais intensas. Particularmente as coletas de 48 horas podem ter apresentado perdas com relação ao material proteico por ficarem muito tempo expostas, em temperaturas médias elevadas. Contudo, pela análise estatística, os grupos 24 horas e 48 horas evidenciaram similaridade nas concentrações. Outra questão, é que os dados climáticos são fornecidos apenas de forma pontual (2 ou 3 horários do dia) e avaliados por média. Os dados de direção do vento são captados pontualmente e não foram balanceados com a intensidade do vento, que poderia influenciar para mais ou para menos em determinada direção.

Os presentes achados de Gly m 1 que evidenciam níveis constantes e por vezes elevados deste alérgeno precisam ser melhor explorados. É fundamental buscar entender o real impacto deste alérgeno na população local, em particular nos trabalhadores da soja e na população vizinha à região fabril. A presença do alérgeno no ar não nos diz sobre o grau de sensibilização daquela população e nem tão pouco sobre as manifestações respiratórias relacionadas ao mesmo.

Testes de provocação nasal, ocular e brônquica poderiam ser elucidadores da real importância clínica nestes indivíduos sensibilizados à soja. Somente desta forma, seria possível determinar se a sensibilização mediada por IgE específica encontrada nestes indivíduos é de fato capaz de gerar sintomas quando o indivíduo é exposto ao alérgeno por meio da via respiratória (ROSARIO, 2012). Embora essas provocações possam ser de auxílio no entendimento da relevância clínica das sensibilizações, vale lembrar da rinite alérgica local, cuja a sensibilização aos testes cutâneos e IgE específicas são negativas e que só apresentarão resposta inflamatória na mucosa nasal mediante contato com o alérgeno. Em suma, uma porcentagem dos indivíduos com sintomas de rinite pode não ser sensibilizada à soja, mas apresentar sintomas em contato com estes alérgenos (EGUILUZ-GRACIA et al., 2020b).

Apesar das limitações apresentadas, o estudo foi inovador por realizar pela primeira vez análises ambientais de alérgenos da poeira da casca da soja (Gly m 1) no Brasil. Os estudos ambientais de aeroalérgenos são fundamentais para o conhecimento do alergista, possibilitando entender o meio ao qual o seu paciente é exposto, identificando os riscos, realizando prevenção e permitindo tratamento personalizado. Em termos de saúde pública, o conhecimento dessas exposições

permite ao alergista atuar de forma conjunta com outros profissionais (biólogos, ambientalistas e engenheiros ambientais) pois fortalece e fomenta as discussões no âmbito político acerca das mudanças climáticas, poluição, emissão de gases e monitoramentos aerobiológicos de todos os tipos.

6 CONCLUSÕES

- 1) O Gly m 1, alérgeno principal da poeira da casca da soja, esteve presente em todas as amostras coletadas durante os 12 meses (de março de 2017 a março de 2018) na cidade de Maringá. A mediana de concentração das amostras foi 4,89 ng/m³ de ar amostrado. Contudo, pode haver enorme variação chegando a níveis elevados de até 1826,1 ng/m³.
- 2) Os níveis de Gly m 1 correlacionaram-se positivamente com as temperaturas máxima, mínima e média compensada, umidade relativa do ar, intensidade do vento e insolação.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença constante de níveis detectáveis de Gly m 1 na atmosfera de Maringá sugere que soja deve fazer parte da investigação do perfil de sensibilização desta população com sintomas de asma e rinite alérgica, em especial, aquelas que vivem nas proximidades da região fabril ou que trabalham na agroindústria. Ademais, embora as concentrações encontradas na maior parte dos dias possam ser interpretadas como baixas, fica a dúvida se, de fato, o são, tendo em vista que estamos dosando apenas 1 dos vários alérgenos da soja presentes na atmosfera e que a sensibilização e desencadeamento de sintomas a estes alérgenos está intimamente relacionado a questões individuais, regionais e populacionais.

A avaliação por meio de ELISA para Gly m 1 dos indivíduos com sensibilização documentada à soja (por teste cutâneo ou IgE específica) pode esclarecer a real sensibilização desta população, se por meio alimentar, respiratório ou ambos. Outro ponto a ser considerado e investigado é se indivíduos sensibilizados por via respiratória poderiam ter sintomas alimentares a soja e vice-versa.

A realização de testes de provocação nasal, ocular ou brônquica com o alérgeno da soja pode esclarecer qual o verdadeiro impacto da dispersão do Gly m 1 na atmosfera sobre os indivíduos sensibilizados à soja.

A investigação da presença de Gly m 1 no ar associado a investigação de material particulado e gases, poderiam trazer novas informações a cerca da relação da dispersão deste alérgeno com fatores poluentes, como já é estudado de forma similar para os alérgenos dos polens.

REFERÊNCIAS

ACEVES, M.; GRIMALT, J.O.; SUNYER, J.; ANTÓ, J.M.; REED, C.E. Identification of soybean dust as an epidemic asthma agent in urban areas by molecular marker and RAST analysis of aerosols. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 88, p. 124–34, 1991.

ADAPAR (AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ).

Disponível em:< <http://www.adapar.gov.pr.br>>. Acesso em: set. 2020.

AGACHE, I.; MILLER, R.; GERN, J.E.; HELLINGS, P.W.; JUTEL, M.; MURARO, A. et al. Emerging concepts and challenges in implementing the exposome paradigm in allergic diseases and asthma: a Practall document. **Allergy**, v. 74, p. 449-63, 2019.

ANTO, J.M.; SUNYER, J.; RODRIGUEZ-ROISIN, R.; SUAREZ-CERVERA, M.; VASQUEZ, L. Community outbreaks of asthma associated with inhalation of soybean dust. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 1097-1102, 1989

ANTO, J.M.; SUNYER, J.; REED, C.E., SABRIA, J.; MARTINEZ, F.; MORELL, F. et al. Preventing asthma epidemics due to soybeans by dust-control measures. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 1760-3, 1993.

ANTO, J.; SUNYER, J.; NEWMAN, T.A. Comparison of soybean epidemic asthma and occupational asthma. **Thorax**, v. 51, p. 743-9, 1996.

ANTONICELLI, L.; RUELLO, M.; MONSALVE, R.; GONZALEZ, R.; FAVA, G.; BONIFAZI F. Assessment of airborne soy-hull allergen (Gly m 1) in the Port of Ancona, Italy. **European Annals of Allergy and Clinical Immunology**, v. 42, p. 178-85, 2010.

ARANDA, C.S.; COCCO, R.R.; PIEROTTI, F.F.; MALLOZI, M.C.; FRANCO, J.M.; PORTO, A. et al. Increased sensitization to several allergens over a 12-year period in Brazilian children. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 29, p. 321-4, 2018.

ARAUJO, L.M.L.; ROSÁRIO, N.A.; MARI, A. Molecular-based diagnosis of respiratory allergic diseases in children from Curitiba, a city in Southern Brazil. **Allergologia et Immunopathologia (Madri)**, v. 44, p.18-22, 2016.

ARRUDA, L.K.; BARBOSA, M.C.R.; BARDINI, G.; YANG, A.C.; GENOV, I.R.; MORENO A.S. Alérgenos recombinantes: papel no diagnóstico e imunoterapia alérgeno-específica. **Brazilian Journal of Allergy and Immunology**, v. 1(4), p. 211-8, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS (ABIOVE). Disponível em:< <http://www.abiove.com.br>>. Acesso em: jun. 2020.

BALMES, J.; BECKLAKE, M.; BLANC, P.; HENNEBERGER, P.; KREISS, K.; MAPP, C. et al. Environmental and Occupational Health Assembly, American Thoracic Society. American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.167, p. 787-97, Mar. 2003.

BATISTA, R.; MARTINS, I.; JENÖ, P.; RICARDO, C.P.; OLIVEIRA, M.M. A proteomic study to identify soya allergens - the human response to transgenic versus non-transgenic soya samples. **International Archives at Allergy and Immunology**, v. 38, p. 29-38, 2007.

BAUR, X.; PAU, M.; CZUPPON, A.; FRUHMANN, G. Characterisation of soybean allergens causing sensitisation of occupationally exposed bakers. **Allergy**, v. 51, p. 326-30, 1996.

BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. A soja no Brasil: história e estatística. Londrina: **EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Documentos 21**, 1987, p. 7-59.

BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. A soja no Brasil. **Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos**, 1977, p. 1-6.

BUSH, R.; COHEN, M. Immediate and late onset asthma from occupational exposure to soybean dust. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 7 (4), p. 369-73, 1977.

BUSH, R.; SCHOECKENSTEIN, D.; MEIER-DAVIS, S. Soybean flour asthma: detection of allergens by immunoblotting. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 82, p. 251-5, 1988.

BUTERS, J.; KASCHE, A.; WEICHENMEIER, I.; SCHOBER, W.; KLAUS, S.; TRIDL-HOFFMANN, C. et al. Year-to-Year Variation in Release of Bet v 1 Allergen from Birch Pollen: Evidence for Geographical Differences between West and South Germany. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 145, p. 122-30, 2008.

BUTERS, J.; WEICHENMEIER, I.; OCHS, S.; PUSCH, G.; KREYLING, W.; BOERE, A.J. et al. The allergen Bet v 1 in fractions of ambient air deviates from birch pollen counts. **Allergy**, v. 65, p. 850-8, 2010.

BUTERS, J.T.M. Pollen allergens and geographical factors. In: AKDIS, C.; AGACHE, I. **Global atlas of allergy. Zurich: European Academy of Allergy and Clinical Immunology**, cap. 31, p. 36–38, 2014.

BUTERS, J.; PRANK, M.; SOFIEV, M.; PUSCH, G.; ALBERTINI, R.; ANNESI-MAESANO, I. et al. Variation of the group 5 grass pollen allergen

content of airborne pollen in relation to geographic location and time in season. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, p. 87-95, 2015.

CANONICA, G.W., ANSOTEGUI, I.J., PAWANKAR, R.; SCHMID-GRENDELMEIER, P.; VAN HAGE, M.; BAENA-CAGNANI, C.E. et al. A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. **World Allergy Organization Journal**, v. 6, p. 1–17, 2013.

CARRENÑO, P.S.; GOMEZ NIEVES, E.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; ABEL FERNANDEZ, E.; CASES, B.; TUDELA, J.I. et al. Immunochemical and physical quantitation of grass and olive pollen allergens and correlation with asthma admissions in Caceres, Spain. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v. 30 (5), p. 334-9, 2020.

CARROLL, R. Epidemiology of New Orleans epidemic asthma. **American Journal of Public Health**, v. 58, p. 1677-1683, 1968.

CECCHI, L.; D' AMATO, G.; AYRES, J.G.; GALAN, C.; FORASTIERE, F.; FORSBERG, B. et al. Projections of the effects of climate change on allergic asthma: the contribution of aerobiology. **Allergy**, v. 65(9), p. 1073-81, 2010.

CECCHI, L.; D' AMATO, G.; ANNESI-MAESANO, I. External exposome and allergic respiratory and skin diseases. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, p. 846-57, 2018.

CECCHI, L.; D'AMATO, G.; ANNESI-MAESANO, I. Climate change and outdoor aeroallergens related to allergy and asthma: Taking the exposome into account. **Allergy**, v. 75, p. 2361-63, 2020

COCCO, G.; SCHIANO, M.; SACERDOTE, G.; SAGLIOCCA, L. Functional characteristics in soybean asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 152, p. 469, 1995.

CODINA, R.; LOCKEY, R.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; RAMA, R. Purification and characterization of a soybean hull allergen responsible for the Barcelona asthma outbreaks. II. Purification and sequencing of the Gly m 2 allergen. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 27 (4), p. 424-30, 1997.

CODINA, R.; LOCKEY, R.F. Possible role of molds a secondary etiologic agents of the asthma epidemics in Barcelona, Spain. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.102, p. 318-20, 1998.

CODINA, R.; OEHLING, A.G.JR.; LOCKEY, R.F. Neoallergens in Heated Soybean Hull. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 117, p. 120–5, 1998.

CODINA, R.; ARDUSSO, L.; LOCKEY, R.; CRISCI, C.; BERTOYA, N. Sensitisation to soybean hull allergens in subjects exposed to different levels of soybean dust inhalation in Argentina. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, p. 570-6, 2000.

CODINA, R.; ARDUSSO, L.; LOCKEY, R.F.; CRISCI, C.D.; JAÉN, C.; BERTOYA, N.H. Identification of the soybean hull allergens involved in sensitization to soybean dust in a rural population from Argentina and N-terminal sequence of a major 50 KD allergen. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 32(7), p. 1059-63, Jul. 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos. Safra 2018/19. Disponível em: < www.conab.gov.br>. Acesso em maio 2020.

CRUZ, M.; RODRIGO, M.; ANTO, J.; MORELL F. An amplified ELISA inhibition method for the measurement of airborne soybean allergens. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.122, p. 42-8, 2000.

D'AMATO, G.; VITALE, C.; LANZA, M.; MOLINO, A.; D'AMATO, M. Climate change, air pollution, and allergic respiratory disease: an update. **Current Opinion of Allergy Clinical and Immunology**, v. 16, p. 434-40, 2016.

D'AMATO, G.; ANNESI-MAESANO, I.; CECCHI, L.; D'AMATO, M. Latest News on relationship between thunderstorms and respiratory allergy, severe asthma, and deaths for asthma. **Allergy**, v. 74(1), p. 9-11, 2019.

D'AMATO, G.; CHONG-NETO, H.J.; ORTEGA O.P.M.; VITALE, C.; ANSOTEGUI, I. ROSÁRIO, N. et al. The effects of climate change on respiratory allergy and asthma induced by pollen and mold allergens. **Allergy**, v. 75, p. 2219-28, 2020a.

D'AMATO, G.; ORTEGA, O.P.M.; ANNESI-MAESANO, I.; D'AMATO, M. Prevention of Allergic Asthma with Allergen Avoidance Measures and the Role of Exposome. **Current Allergy and Asthma Reports**, v.20(3), Feb. 2020b. DOI: 10.1007/s11882-020-0901-3.

DAVIES, J.M.; THIEN, F.; HEW, M. Thunderstorm asthma: controlling (deadly) grass pollen allergy. **BMJ**, v. 360, k432, 2018.

DUKE, W.W. Soybean as a possible Important source of allergy. **Journal of Allergy**, v. 5, p. 300-2, 1934.

EGUILUZ-GRACIA, I.; MATHIOUDAKIS, A.G.; BARTEL, S.; VIJVERBERG, S.J.H.; FUERTES, E.; COMBERIATI, P. et al. The need for clean air: The way air pollution and climate change affect allergic rhinitis and asthma. **Allergy**, v. 75(9), p. 2170-84, Set. 2020a.

EGUILUZ-GRACIA, I.; FERNANDEZ-SANTAMARIA, R.; TESTERA-MONTES, A.; ARIZA, A.; CAMPO, P.; PRIETO, A. et al. Coexistence of nasal reactivity to allergens with and without IgE sensitization in patients with allergic rhinitis. **Allergy**, v. 75, p. 1689-1698, Jul. 2020b.

FORTE, W.C. **Imunologia do básico ao aplicado**, 2ª edição. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2007.

FRENZ, D.A. Comparing pollen and spore counts collected with the Rotorod Sampler and Burkard spore trap. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 83, p. 341-9, 1999.

GARCIA-ORTEGA, P.; ROVIRA, E.; BARTOLOME, B.; MARTINEZ, A.; MORA, E.; RICHART, C. Outbreak of asthma caused by soybean dust allergy. Clinical and immunologic study of the affected patients. **Medicina Clínica (Barc)**, v. 110, p 731-5, 1998.

GIJZEN, M.; GONZALEZ, R.; BARBER, D.; POLO, F. Levels of airborne Gly m 1 in regions of soybean cultivation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112(4), p. 803-5, Oct. 2003.

GÓMEZ-OLLÉS, S.; CRUZ, M.; RENSTRÖM, A.; DOEKES, G.; MORELL, F.; RODRIGO, M. An amplified sandwich EIA for the measurement of soy aeroallergens. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36(9), p.1176-83, 2006.

GONZÁLEZ, R.; ZAPATERO, L.; CARAVACA, F.; CARREIRA, J. Identification of soybean proteins responsible for respiratory allergies. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 95(1), p. 53-7, 1991.

GONZÁLEZ, R.; POLO, F.; ZAPATERO, L.; CARAVACA, F.; CARREIRA, J. Purification and characterization of major inhalant allergens from soybean hulls. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 22(8), p. 748-55, 1992.

GONZALEZ, R.; VARELA, J.; CARREIRA, J.; POLO, F. Soybean hydrophobic protein and soybean hull allergy (Letter). **Lancet**, v. 346, p.48-9, 1995.

GONZALEZ, R.; DUFFORT, O.; CALABOZO, B.; BARBER, D.; CARREIRA, J.; POLO, F. Monoclonal antibody-based method to quantify Gly m 1. Its application to assess environmental exposure to soybean dust. **Allergy**, v. 55, p. 59-64, 2000.

HARRIS-ROBERTS, J.; ROBINSON, E.; FISHWICK, D.; FOURIE, A.; REES, D.; SPIES, A. et al. Sensitization and symptoms associated with soybean exposure in processing plants in South Africa. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 55, p. 458-64, 2012.

HEEDERIK, D.; DOEKES, G.; VAN STRIEN, R.; BRUNEKREEF, B. Daily changes of peak expiratory flow and respiratory symptom occurrence around a soy processing factory. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 21(1), p. 5-10, 2014.

HENNENBERGER, P.K.; REDLICH, C.A.; CALLAHAN, D.B.; HARBER, P.; LEMIÈRE, C.; MARTIN, J. et al. An official american thoracic society statement: work-exacerbated asthma. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v. 184, p. 368-78, Aug. 2011.

HERIAN, A.M.; BUSH, R.K.; TAYLOR, S.L. Protein and allergen content of commercial skin test extracts for soybeans. **Clinical and Experimental of Allergy**, v. 22(4), p. 461-8, 1992.

HERNANDO L., NAVARRO C., MARQUEZ M., et al. Asthma epidemics and soybean in Cartagena. (Letter). **Lancet**, v. 1, p.502, 1989.

HEW, M.; LEE, J.; SUSANTO, N.H.; PRASAD, S.; BARDIN, P.G.; BARNES, S. et al. The 2016 Melbourne thunderstorm asthma epidemic: 1 risk factors for severe attacks requiring hospital admission. **Allergy**, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/all.13609>>.

HOLZHAUSER, T.; WACKERMANN, O.; BALLMER-WEBER, B.; BINDSLEV-JENSEN, C.; SCIBILIA, J.; PERONO- GAROFFO, L. et al. Soybean (Glycine max) allergy in Europe: Gly m 5 (b-conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, p. 452-8, 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Indicadores IBGE de 2019. Disponível em :< <https://biblioteca.ibge.gov.br>>. Acesso em jul. 2020.

KING TP, HOFFMAN D, LOWENSTEINH H, MARSH DG, PLATTS-MILLS TA, THOMAS W. Allergen nomenclature. **Allergy**, v. 50(9), p. 765-74, 1995.

KLEINE-TEBBE, J.; BEYER, K.; EBISAWA M. Soy Allergy. In: **Molecular Allergology User's Guide by European Academy of Allergy and Clinical Immunology**, p.225-34, 2016.

KLEMANS, R.; KNOL E, MICHELSEN-HUISMAN A, PASMANS S, DE KRUIJF-BROEKMAN W, BRUIJNZEEL-KOOMEN C, et al. Components in soy allergy diagnostics: Gly m 2S albumin has the best diagnostic avlue in adults. **Allergy**, v. 68(11), p. 1396-1402, 2013.

KNOX, R.B. Grass pollen, Thunderstorms and asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 23(5), p. 354-59, 1993.

KNOX, R.B.; SUPHIOGLU, C.; TAYLOR, P.; DESAI, R.; WATSON, H.C.; PENG, J.L. et al. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 27(3), p. 246-51, 1997.

LADICS, G.S.; BUDZISZEWSKI, G.J.; HERMAN, R.A.; HEROUET-GUICHENEY, C.; JOSHI, S.; LIPSCOMB, E.A. et al. Measurement of

endogenous allergens in genetically modified soybeans – Short communication. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 70, p. 75–9, 2014.

LEVETIN, E. Methods for Aeroallergen Sampling. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 4, p.376-83, 2004.

L'HOCINE, L.; BOYE, J.I. Allergenicity of soybean: New developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 47, p. 127-143, 2007.

MAGGIO, P.; MONSÓ, E.; BALTASAR, M.; MORERA, J. Occupational asthma caused by soybean hull: a workplace equivalent to epidemic asthma. **Allergy**, v. 58(4), p. 350-1, 2003.

MASON, H.; GÓMEZ-OLLÉS, S.; CRUZ M.J.; ROBERTS P.; THORPE A, EVANS G. Quantifying Dustiness, Specific Allergens and Endotoxin in Bulk Soya Imports. **Environments**, v. 4(4), p.76, 2017.

MILLS, E.N.C.; JENKINS, J.A.; ALCOCER, M.J.C.; SHEWRY, P.R. Structural, biological and evolutionary relationships of plants food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, p. 379-407, 2004.

MITTAG, D.; VIETHS, S.; VOGEL, L.; BECKER, W.; RIHS, H.; HELBLING, A. et al. Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 41(3), p. 148-154, 2001.

MUKAKA, M.M. Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. **Malawai Medical Journal**, v. 24 (3), p. 69-71, set. 2012.

MULLINS, J.; EMBERLIN, J. Sampling Pollens. **Journal of Aerosol Science**, v. 28(3), p. 365-70, 1997.

NAVARRO, C.; MÁRQUEZ, M.; HERNANDO, L.; GALVAÑ, F.; ZAPATERO, L.; CARAVACA, F. Epidemic asthma in Cartagena, Spain, and its association with soybean sensitivity. **Epidemiology**, v. 4, p. 76-9, Jan. 1993.

OBSERVATÓRIO DAS METRÓPOLES/CCH- NÚCLEO UEM (Universidade Estadual de Maringá). Disponível em <<http://www.observatoriodasmetropolesmaringa.com>>. Acesso em: dez. 2019.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]: key food and feed nutrients, antinutrients, toxicants and allergens. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 25, 2012.

OLSEN A.M.; PRICKMAN L.E. Hypersensitivity to soy beans. **Proceedings of the staff meetings of the Mayo Clinic**, v. 11, p. 465-69, 1936.

OGAWA, T.; TSUJI, H.; BANDO, N.; KITAMURA K, ZHU Y, HIRANO H, et al. Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57(6), p.1030-3, 1993.

PALLFLEX AIR MONITORING SAMPLES, **Pall Life Sciences**. Disponível em: <<http://www.pall.com>>. Acesso em: jan. 2020

PENDINO, P.; AGÜERO, C.; CAVAGNERO, P.; LOPEZ, K.; KRIUNIS, I.; MOLINAS, J. Aeroallergen sensitization in wheezing children from Rosario, Argentina. **World Allergy Organization Journal**, v. 4(10), p. 159-163, 2011.

PEPYS J. Occupational allergic lung diseases caused by organic agents. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 5, p. 1058-62, 1986.

PICADO, C. Barcelona's asthma epidemics: clinical aspects and intriguing findings. **Thorax**, v. 47, p. 197-200; 1992.

PINTO RJ, CROCE J; KALIL J, CARDOSO MR. Poeria de soja inalada e alergia respiratória no Brasil. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 30(5), p. 198-203, 2007.

RIASCOS, J.; WEISSINGER, S.; WEISSINGER, A.; KULIS, M.; BURKS, A.; PONS, L. The Seed Biotinylated Protein of Soybean (Glycine max): A Boiling-Resistant New Allergen (Gly m 7) with the Capacity To Induce IgE-Mediated Allergic Responses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 3890-900, 2016.

RIHS, H.; CHEN, Z.; RUËFF, F.; PETERSEN, A.; ROZYNEK, P.; HEIMANN, H. et al. IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 90(6), p. 1293-1301, 1991.

RODRIGO, M.J.; MORELL, F.; HELM, R.M.; SWANSON, M.; GREIFE A.; ANTO J.M. et al. Identification and partial characterization of soybean-dust allergens involved in the Barcelona asthma epidemic. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 85, p. 778–784, 1990.

RODRIGO, M.J.; CRUZ, M.J.; GARCIA, M.D.; ANTO, J.M.; GENOVER, T.; MORELL, F. Epidemic asthma in Barcelona: an evaluation of new strategies for the control of soybean dust emission. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 134, p. 158-64, 2004.

ROSARIO FILHO, N.A. Contagem de polens aéreos na cidade de Curitiba. **Revista Brasileira de Alergia e Imunologia**, v. 6, p.12-5, 1983.

ROSARIO FILHO, N.A. Alergia ao pólen de gramíneas: "back to the future". **Revista Brasileira de Alergia e Imunologia**, v. 35(2), p. 82-4, 2012.

ROSARIO FILHO, N.A. Poluição, aquecimento global e alergia. **Arquivos de Asma Alergia e Imunologia**, v. 1(2), p. 236-8, 2017.

ROVIRA, E.; CUADRAS, A.; GAIG, P.; GÁZQUEZ, V.; DALMAU, G.; GÓMEZ-OLLÉS, S. et al. Soybean hull unloading in Tarragona (Spain) and asthma outbreak risk. **Gaceta Sanitaria**, v. 24, p. 109-114, 2010.

SEGHESE, M.A. **Projeto Vida no Campo**. Editora Massoni, 1º edição, Maringá, PR, 2009.

SHIBASAKI, M.; SUZUKI, S.; TAJIMA, S.; NEMOTO, H.; KUROUME, T. Allergenicity of major component proteins of soybean. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 61, p. 441-448, 1980.

SORIANO, J.; ERCILLA, G.; SUNYER, J.; REAL, F.; LÁZARO, C.; RODRIGO, M. et al. HLA Class II Genes in Soybean Epidemic Asthma Patients. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. V, 156, p.1394-8, 1997.

SUNYER, J.; ANTO J.M.; RODRIGO, M.J.; MORELL, F. Epidemic asthma and soybean IgE antibodies. **Lancet**, v. 1, p. 179-82, 1989.

SUNYER, J.; ANTO J.; RODRIGO, M.; ROCA, J.; MORELL, F. Risk factors of soybean epidemic asthma: the role of smoking and atopy. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 145, p. 1096-1102, 1992.

THOM DE SOUZA, C.C.; ROSÁRIO FILHO, N.A.; CAMARGO, J.F.; GODOI, R.H.M. Levels of Airborne Soybean Allergen (Gly m 1) in a Brazilian Soybean Production City: A Pilot Study. **International Journal of**

Environmental Research in Public Health, v. 17(15):5381, 2020a.
doi:10.3390/ijerph17155381.

THOM DE SOUZA, C.C.; FEDERLE, N.; MANFREDO, M.F.; SILVA, M.A.
Perfil de Sensibilização alérgica de crianças asmáticas em ambulatório de pneumologia pediátrica em Maringá-PR. In: **XLVII Congresso Brasileiro de Alergia e Imunologia**, ONLINE, 2020b. Apresentação em Pôster.

VALENTA, R.; KARAULOV, A.; NIEDERBERGER, V.; PIA, G.; VAN HAGE, M.; FLICKER, S. et al. **Advances in Immunology**: Chapter Five - Molecular Aspects of Allergens and Allergy, Editora: Frederick Alt, Academic Press, v. 138, p. 195-256, 2018.

VIEIRA, F.A.M. Diagnóstico molecular por componentes e polinose por gramíneas no trópico brasileiro: "uma mira no alvo". **Brazilian Journal of Allergy and Immunology**, v. 2, p. 248-9, 2014.

VILLALBI, J.R.; PLASENCIA, A.; MANZARENA, R.; ARMENGOL, R., ANTÓ, J.M. Collaborative and Technical Support Groups for the study of soybean asthma in Barcelona. Epidemic soybean asthma and public health: new control systems and initial evaluation in Barcelona, 1996-98. **Journal of Epidemiology Community Health**, v. 58, p. 461-5, 2004.

WIGHTMAN, H.B. Soybean sensitivity with a case report. **Journal of Allergy**, v. 9, p. 601-3, 1938.

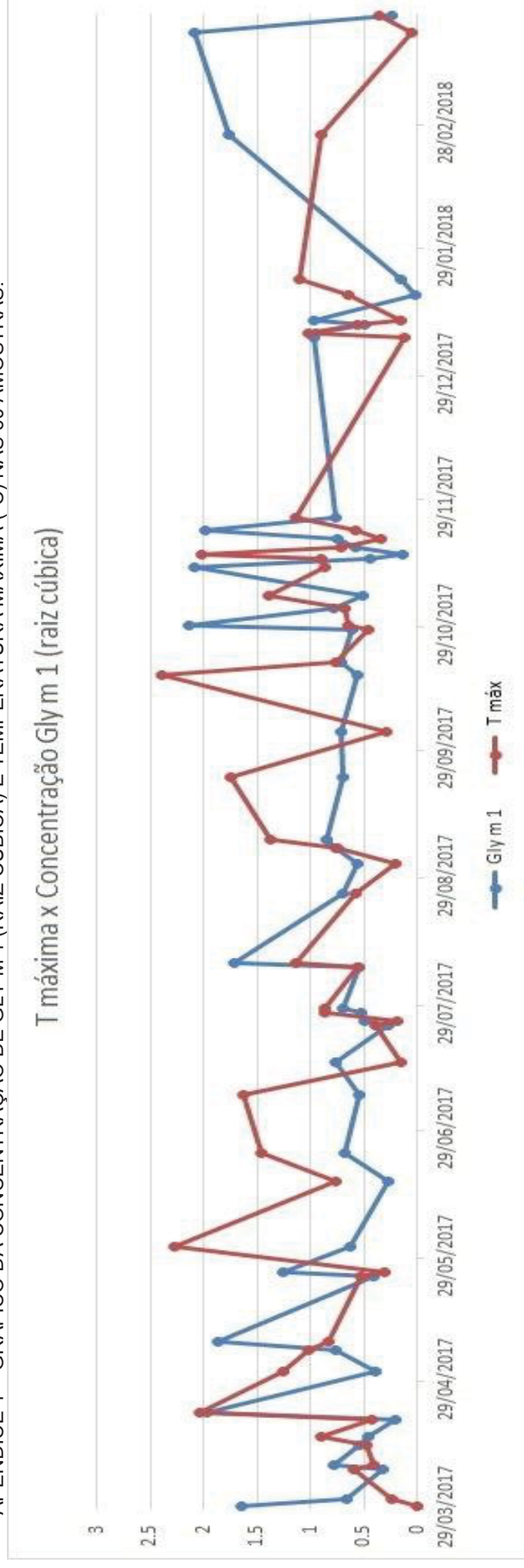
World Health Organization. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1998.

ZAPATERO, L.; GONZALEZ, R.; CARAVACA, F.; CARREIRA, J.; MARQUEZ, M.; HERNANDO, L. et al. Identificación del polvo de soja como agente causal de las epidemias de asma ocurridas en Cartagena (Murcia). **Revista Espanhola de Alergologia e Imunologia Clinica**, v. 9, p. 37-42, 1994.

ZUSKIN, E.; KANCELJAK, B.; SCHACHTER, E.; WITEK, T.; MAROM, Z.; GOSWAMI, S. et al. Immunological and respiratory changes in soy bean workers. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 63, p. 15-20, 1991.

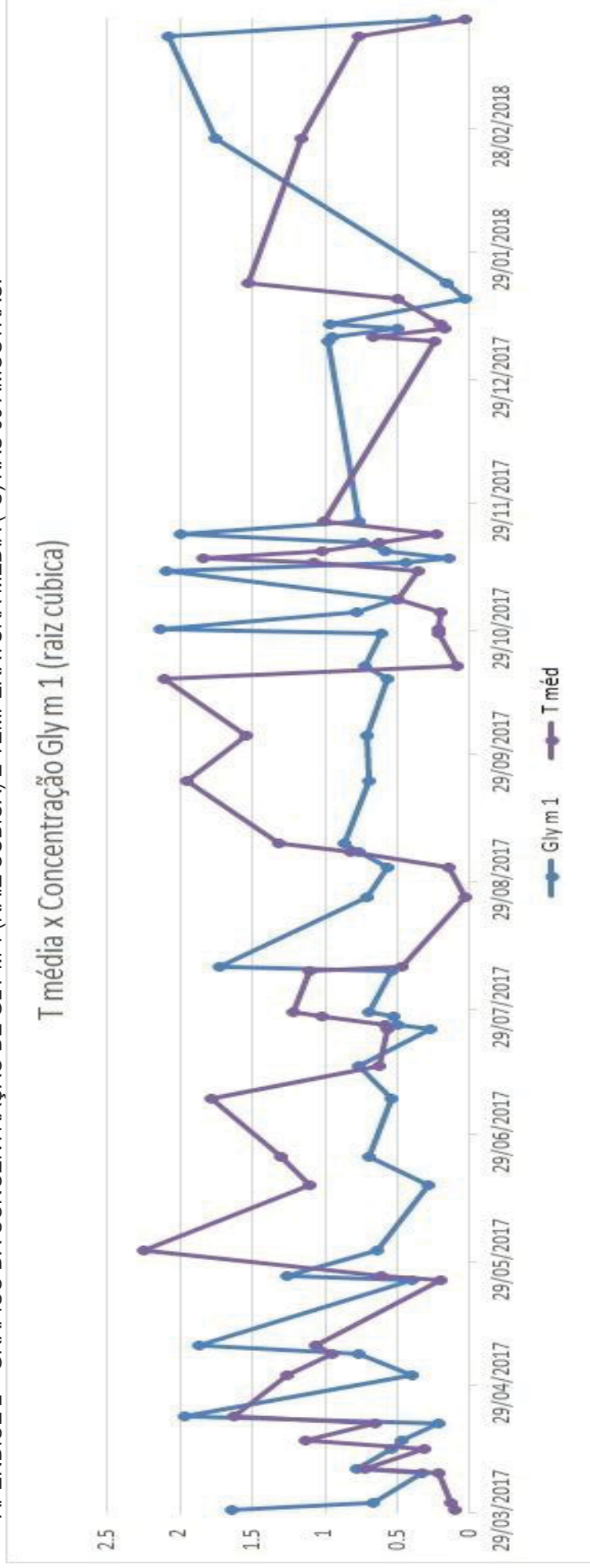
APÊNDICES

APÊNDICE 1 – GRAFICO DA CONCENTRAÇÃO DE GLY M 1 (RAIZ CÚBICA) E TEMPERATURA MÁXIMA (°C) NAS 60 AMOSTRAS.



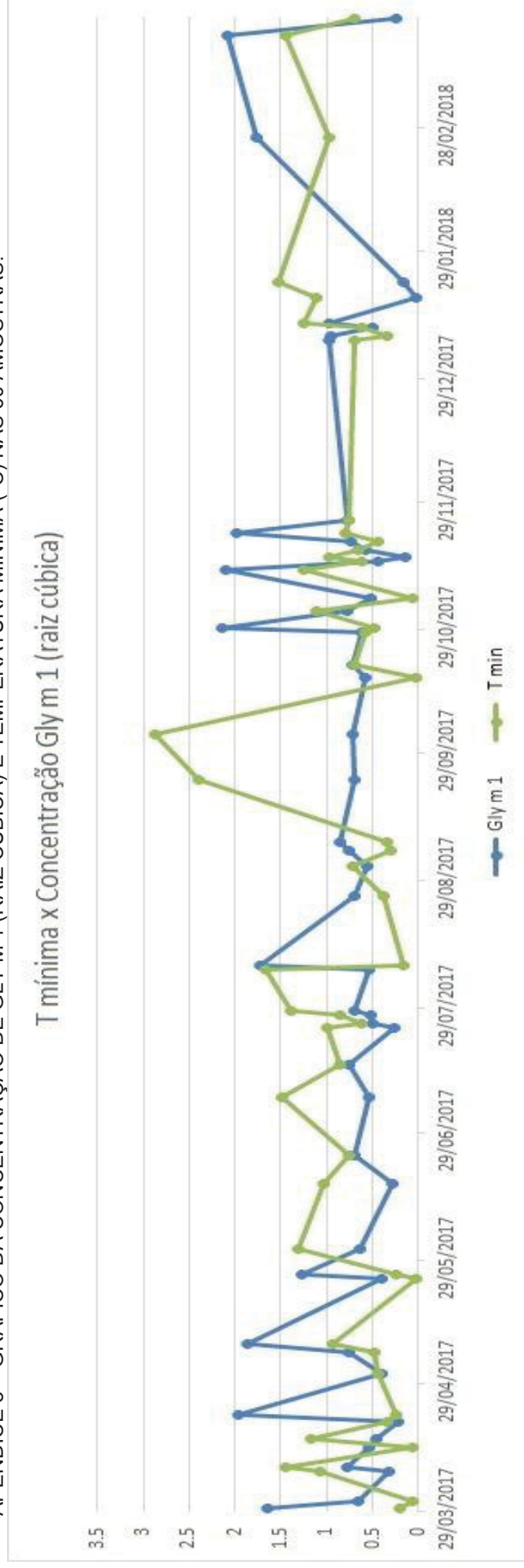
FONTE: A autora (2020)

APÊNDICE 2 – GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO DE GLY M 1 (RAIZ CÚBICA) E TEMPERATURA MÉDIA (°C) NAS 60 AMOSTRAS.



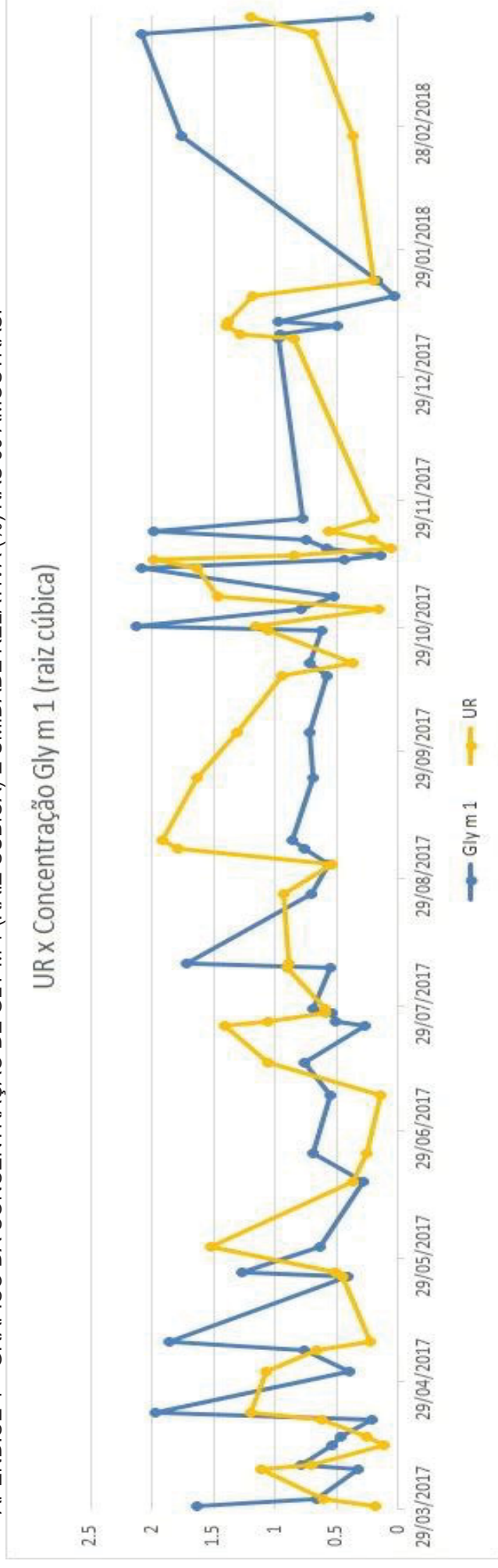
FONTE: A autora (2020)

APÊNDICE 3 – GRAFICO DA CONCENTRAÇÃO DE GLY M 1 (RAIZ CÚBICA) E TEMPERATURA MÍNIMA (°C) NAS 60 AMOSTRAS.



FONTE: A autora (2020)

APÊNDICE 4 – GRAFICO DA CONCENTRAÇÃO DE GLY M 1 (RAIZ CÚBICA) E UMIDADE RELATIVA (%) NAS 60 AMOSTRAS.



FONTE: A autora (2020)

APÊNDICE 5 – CORRELAÇÕES E REGRESSÕES LINEARES DAS AMOSTRAS DE GLY M 1 (N=60) COM FATORES CLIMÁTICOS

	CONCENTRAÇÃO GLY M1 (NG/M ³)			CONCENTRAÇÃO GLY M1 (LOG ₁₀)			CONCENTRAÇÃO GLY M1 (RAIZ2)			CONCENTRAÇÃO GLY M1 (RAIZ3)			CONCENTRAÇÃO GLY M1 (1:[])		
	R	R ²	p-valor	R	R ²	p-valor	R	R ²	p-valor	R	R ²	p-valor	R	R ²	p-valor
Temperatura Máxima	0,33	0,11	0,008	0,73	0,53	<0,001	0,55	0,31	<0,001	0,72	0,51	<0,001	0,65	0,42	<0,001
Temperatura Mínima	0,33	0,11	0,011	0,71	0,5	<0,001	0,54	0,29	<0,001	0,7	0,49	<0,001	0,67	0,44	<0,001
Temperatura Média	0,33	0,11	0,01	0,72	0,51	<0,001	0,54	0,3	<0,001	0,71	0,5	<0,001	0,66	0,43	<0,001
Umidade Relativa (UR**)	0,39	0,15	0,002	0,75	0,56	<0,001	0,6	0,36	<0,001	0,75	0,56	<0,001	0,63	0,4	<0,001
Precipitação	0,27	0,07	0,034	0,37	0,14	0,003	0,36	0,13	0,005	0,4	0,16	0,001	0,4	0,16	0,001
Insolação	0,29	0,08	0,024	0,66	0,43	<0,001	0,49	0,24	<0,001	0,64	0,41	<0,001	0,58	0,34	<0,001
Intensidade do vento	0,42	0,18	0,001	0,67	0,45	<0,001	0,57	0,33	<0,001	0,69	0,48	<0,001	0,6	0,36	<0,001
Direção do vento	0,21	0,05	0,1	0,32	0,1	0,012	0,31	0,1	0,017	0,32	0,1	0,012	0,32	0,1	0,012
Multivariada com todas as variáveis sem direção	0,51	0,26	NS*	0,61	0,55	0,02 para UR**	0,65	0,43	0,038 para UR**	0,78	0,6	0,021 para UR**	0,7	0,49	NS*
Multivariada com todas as variáveis	0,51	0,26	NS*	0,79	0,63	NS*	0,66	0,44	NS*	0,79	0,62	NS*	0,72	0,52	NS*

FONTE: A autora (2020)

NOTA: NS*= não significativo; UR**= umidade relativa

APÊNDICE 6 – CORRELAÇÕES E REGRESSÕES LINEARES DAS AMOSTRAS SEM OUTLIERS DE GLY M 1 (N=52) COM FATORES CLIMÁTICOS

	CONCENTRAÇÃO Gly m 1 (ng/m³)			CONCENTRAÇÃO Gly m 1 (LOG ₁₀)			CONCENTRAÇÃO Gly m 1 (Raiz Quadrada)			CONCENTRAÇÃO Gly m 1 (Raiz Cúbica)			CONCENTRAÇÃO GLY M1 (1/ng.m³)		
	R	R²	p	R	R²	p	R	R²	p	R	R²	p	R	R²	p
Temperatura Máxima	0,53	0,3	<0,001	0,77	0,59	<0,001	0,74	0,54	<0,001	0,86	0,73	<0,001	0,69	0,47	<0,001
Temperatura Mínima	0,52	0,27	<0,001	0,76	0,57	<0,001	0,73	0,53	<0,001	0,85	0,72	<0,001	0,7	0,49	<0,001
Temperatura Média	0,52	0,27	<0,001	0,76	0,58	<0,001	0,73	0,54	<0,001	0,85	0,73	<0,001	0,79	0,48	<0,001
Umidade Relativa	0,52	0,27	<0,001	0,74	0,55	<0,001	0,72	0,51	<0,001	0,83	0,69	<0,001	0,69	0,47	<0,001
Precipitação	0,29	0,08	0,038	0,29	0,08	0,038	0,33	0,11	0,017	0,36	0,13	0,008	0,46	0,21	0,001
Insolação	0,48	0,23	<0,001	0,71	0,51	<0,001	0,68	0,46	<0,001	0,79	0,62	<0,001	0,61	0,37	<0,001
Intensidade do vento (IV*)	0,4	0,16	0,003	0,65	0,42	<0,001	0,61	0,38	<0,001	0,74	0,55	<0,001	0,69	0,47	<0,001
Direção do vento	0,12	0,01	0,407	0,22	0,05	0,11	0,21	0,05	0,123	0,28	0,08	0,045	0,38	0,15	0,05
Multivariada com todas as variáveis sem direção do vento	0,62	0,39	0,022 para IV*	0,81	0,66	0,008 para IV*	0,79	0,62	0,013 para IV*	0,88	0,78	0,012 para IV*	0,77	0,59	0,013 para precipitação e 0,019 IV*
Multivariada com todas as variáveis	0,63	0,4	0,018 para IV*	0,82	0,67	0,006 para IV*	0,79	0,63	0,011 para IV*	0,89	0,78	0,01 para IV*	0,78	0,6	0,017 para precipitação e 0,016 IV*

FONTE: A autora (2020)

NOTA: *IV= intensidade do vento

PRODUÇÃO ACADÊMICA



Communication

Levels of Airborne Soybean Allergen (Gly m 1) in a Brazilian Soybean Production City: A Pilot Study

Cinthya Covessi Thom de Souza ^{1,*}, Nelson Augusto Rosário Filho ^{1,*},
Juliana Francis de Camargo ² and Ricardo Henrique Moreton Godoi ²

¹ Department of Pediatrics, Federal University of Paraná, Curitiba 80060-240, Brazil

² Department of Environmental Engineering, Federal University of Paraná, Curitiba 80060-240, Brazil;
julianafcamargo01@gmail.com (J.F.d.C.); rhmgodoi@gmail.com (R.H.M.G.)

* Correspondence: cinthyathom@yahoo.com.br (C.C.T.d.S.); nelson.rosario@ufpr.br (N.A.R.F.)

Received: 29 February 2020; Accepted: 23 April 2020; Published: 26 July 2020



Abstract: Asthma epidemics have been shown to be related to where soybeans are loaded and handled, but data are scarce in the literature. This pilot study evaluated the levels of Gly m 1 in dust samples collected in Maringá, Brazil, a city with high soy production and processing. A dust impactor was used to collect seven isolated samples during 2015 and 2016. Samples were analyzed by an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) detection method. Gly m 1 was found in all samples, ranging from 0.82–24.38 ng/m³ (median 2.41), regardless of the month or year evaluated. The levels of Gly m 1 were considered low, but the concentrations required to cause sensitization and symptoms are uncertain.

Keywords: allergy; soybean hulls; Gly m 1; monitoring; air samples

1. Introduction

Soybean (*Glycine max*) is the principal oleaginous species currently cultivated, and Brazil is the world's second largest soybean producer. Nevertheless, soybean is composed of a range of proteins with a high allergenic potential [1].

There are three distinct groups of individuals affected by soybean protein allergens. The first comprises young infants with early gastrointestinal sensitization to stable soybean allergens (Gly m 5, 6, 8) who present food allergies with severe systemic reactions. The second comprises atopic individuals sensitized to birch pollen (Bet v 1) with cross-reactivity to soybean PR-10, Gly m 4. These individuals show oropharyngeal and sometimes systemic allergic symptoms. The last group shows respiratory symptoms to soybean dust. Exposure to soybeans induces IgE-mediated sensitization to hull allergens (Gly m 1, Gly m 2), especially in occupationally exposed individuals [2].

The first report of asthma caused by exposure to soybean dust was described in 1934 [3] in five workers exposed to soybean flour. During the 1980s, some asthma outbreaks were associated with the inhalation of soybean dust during soy unloading in some European harbors, especially in Barcelona, where 26 outbreaks of asthma affected a total of 688 individuals [4,5]. Thus, occupational asthma and rhinitis due to soybean dust proteins have been considered in predisposed individuals, although the concentrations of soybean hull allergens that can cause sensitization and symptoms are still unknown.

In the late 1980s, Rodrigo et al. identified patients who suffered from soy epidemic asthma, which produced specific IgEs to low-molecular-mass proteins in soybean hulls [6]. In 1992, Gonzalez et al. identified Gly m 1 as the main allergen responsible for these asthma outbreaks [7,8]. Soybean IgE antibodies were identified in 84.9% of epidemic asthmatics population in Barcelona by radioimmunoassay, compared with 5.8% of non-epidemic asthmatic population. In 1995, this low-molecular-weight allergen with approximately 8 kDa, Gly m 1, was recognized as a producer

of specific IgE in 90.5% of epidemic asthmatics by ELISA and was shown to be different from those causing soy food allergies [9]. Then, in 2000, Gonzalez et al. developed a monoclonal antibody-based method to quantify Gly m 1 with high sensitivity [10].

Despite the importance of this crop in Brazil, it remains unknown whether Gly m 1 is present in the air in regions where soybeans are widely cultivated, harvested and handled. Previous Brazilian research found greater sensitization among people living near areas of soybean plantation, although the concentrations of airborne allergens have not been evaluated [11].

Maringá is a Brazilian grain-producing city with about 400 thousand inhabitants. A large part of its agribusiness regions is located next to the main areas of the products and direct purchases from the producers. Thus, the production and logistic chain involved ends up concentrating cooperatives and processing industries close to or even within urban areas. It is estimated that a population of about 100,000 inhabitants lives within a 5 km radius of the main cooperative in the city. In addition, highways very close to the city transport soy to industries inside and outside the city. The present pilot study was undertaken to measure Gly m 1 in the atmosphere of Maringá by a monoclonal antibody-based method.

2. Materials and Methods

A method based on air sampling with ELISA-based detection was used to measure Gly m 1. Teflon filters (Pallflex® membrane filters) were used, and air samples were obtained using an impactor of total particulate that was located outside, 60 cm from the ground, with a flow rate of 28 L/min. The collection point was located in an urban region of Maringá, latitude 23.41° S, longitude 51.97° W, 521 m above sea level and 2.5 km from the most important soybean industry in the region. The samples were collected once a month for 24 h from September 2015 to April 2016, totaling seven samples. After collection, filters were stored and frozen (−20 °C) until analysis. For preparing the ELISA, small pieces (3 cm²) of the filters were incubated with 3 mL of PBS (phosphate buffered saline), containing 1% BSA (bovine serum albumin) and 0.1% Tween 20 (PBS-BSA-T), in an orbital shaker overnight at 4 °C. Afterward, the solution was recovered and filtered through a 0.22-mm filter. Then, the samples were analyzed by ELISA for Gly m 1. It was a direct ELISA with a quantification limit of 0.4 ng/mL. This method is highly specific for Gly m 1 and does not lead to cross-reactivity or false positives with other allergens. The test was performed with ELISA plates pre-sensitized with a monoclonal antibody, anti-Gly m 1. The wells then were washed and sequentially incubated in duplicate with samples and references (standard, controls and blank filters), and biotin-labeled with anti-Gly m 1 mAb 1G10 and streptavidin/peroxidase conjugate. Finally, the wells were incubated for 30 min at room temperature in the dark with a solution of o-phenyldiamine, and the color reaction was stopped by adding HCl. The optical density was then read at 490 nm with a 650-nm reference filter (previously described in Gonzalez 2000) [10].

3. Results

Gly m 1, ranging from 0.82–24.38 ng/m³, with a median of 2.41 ng/m³, was found in all seven samples. The highest concentration was found in September 2015, and the lowest in March 2016 (Table 1).

Table 1. Concentration of Gly m 1 in each monthly sample.

Sample Filter	Gly m 1 (ng/m ³)	Month
Blank (control)	0.13	—
1	24.38	Sept 2015
2	3.95	Oct 2015
3	2.13	Dec 2015
4	2.41	Jan 2016
5	1.27	Feb 2016
6	0.82	Mar 2016
7	5.88	Apr 2016

4. Discussion

The results of this study confirm, for the first time, the presence of Gly m 1 in the atmosphere in Brazil. Although Brazil, and in particular the city of Maringá and its surroundings, is a major producer of soybeans, thus far, there have been no qualitative or quantitative assessments of soybean dust allergens in Brazil.

The ELISA technique used to evaluate the presence of Gly m 1 is highly sensitive, which allowed us to identify this allergen in all samples, even in very small quantities and in different months, regardless of the climatic conditions.

Theoretically, in the months of soybean harvest (February, March and April), there would be a greater propensity for the dispersion of soy allergens in the air. However, we did not find differences between these months and the others, except for the September sample, in which the concentration was higher than those for the other months. Nonetheless, the greater dispersion of allergens during the harvest period should not be easily demonstrated, because soybeans are stored, handled and processed throughout the year. Presumably, this highest concentration found in September was due to the climate, humidity and winds. It was not possible to establish statistical correlations between the climatic conditions and samples because there were too few samples.

The concentration of Gly m 1 that causes symptoms has not yet been established. Gijzen et al. [12] found a concentration of 73 ng/m³ in Canada during harvest. Antonicelli et al. [13] found concentrations higher than 100 ng/m³ in the port of Ancona, Italy. Neither of these values correlated with asthma outbreaks. This is possibly due to the environmental factors (climate, humidity, pollution, wind direction) inherent in each site, which may or may not lead to the dispersion of allergens as well as the triggering of symptoms.

Considering the number of patients who presented asthma during the outbreak in Barcelona, Spain, the frequency of soybean dust allergenicity has been estimated to be approximately 1 per 1700 people [14]. Current knowledge is not clear regarding how much Gly m 1 is needed to cause allergic sensitization.

Codina et al. [15] (2000) found that sensitization was present in Argentinians with asthma who had indirect exposure to soybean dust (20.3% with a positive prick test) and even in urban individuals who were not exposed to soybean dust (8.4% with a positive prick test). They concluded that there was a high prevalence of sensitivity to soybean hulls in subjects with asthma or allergic rhinitis, and an association between sensitivity to soybean hulls, the severity of asthma and the level of exposure to soybean dust. In Brazil, Pinto et al. [11] (2007) showed that soybean workers, as well as the surrounding population, from rural or urban areas had 15% and 22% soybean sensitizations. Despite the low concentrations of Gly m 1 found in this study, it is possible that there is a high level of sensitization to the Gly m 1 soybean hull allergen in the Maringá population. As the concentrations found were not enough to cause symptoms, there is a potential for clinical investigation in situations of increasing concentrations as to when this sensitized population may experience symptoms.

Furthermore, sensitization and symptoms are not exclusively related to the concentration of airborne Gly m 1. In 1998, Codina et al. [16] showed that soybean hull allergenicity is affected by

heat and suggested that warming during the storage and transport of soybeans could produce two new allergen determinants or increase the epitope exposure by conformational changes. In addition, genetic predisposition could contribute to the response of some patients with asthma to exposure to soybean dust. Soriano et al. [5] found that the risk of epidemic asthma was mainly associated with HLA (human leukocyte antigen) DRB1*13.

The limitation of this study is the small number of samples. Nonetheless, the data were sufficient to detect the environmental presence of Gly m 1.

5. Conclusions

In conclusion, these results showed the constant presence of Gly m 1, suggesting that this allergen could be responsible for the allergic sensitization of susceptible individuals living in Maringá. However, the clinical impact of this exposure was not assessed in this study. Other studies with frequent measurements and climatic correlation as well as data on the sensitization of this population are needed to improve understanding of the real impact of this allergen in this population.

Author Contributions: C.C.T.d.S. contributed with data collection, interpretation and analysis of data, as well writing; N.A.R.F. contributed with analysis of data and revision and content of this manuscript. R.H.M.G. and J.F.d.C. contributed to the critical revision and content of this manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors would like to thank the researcher Rosa Gonzalez, who contributed with analyses of filters. The authors would like to thank the Academic Publishing Advisory Center (Centro de Assessoria e Publicação Acadêmica, CAPA—www.capa.ufpr.br) of the Federal University of Paraná for assistance with English language translation and editing. The authors would like to thank the PRPPG (Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação) of Federal University of Paraná for funding this publication.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.






References

1. L'Hocine, L.; Boye, J.I. Allergenicity of soybean: New developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, *47*, 127–143. [CrossRef] [PubMed]
2. Kleine-Tebbe, J.; Beyer, K.; Ebisawa, M. Soy allergy. In *EAACI Molecular Allergyuser's Guide*; European Academy of Allergy and Clinical Immunology: Zurich, Switzerland, 2016; pp. 225–234.
3. Duke, W.W. Soybean as a possible important source of allergy. *J. Allergy* **1934**, *5*, 300–302. [CrossRef]
4. Rodrigo, M.J.; Cruz, M.J.; Garcia, M.D.; Antó, J.M.; Genover, T.; Morell, F. Epidemic asthma in Barcelona: An evaluation of new strategies for the control of soybean dust emission. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2004**, *134*, 158–164. [CrossRef] [PubMed]
5. Soriano, J.B.; Ercilla, G.; Sunyer, J.; Real, F.X.; Lázaro, C.; Rodrigo, M.J.; Estivill, X.; Roca, J.; Rodríguez-Roisin, R.; Morell, F.; et al. HLA Class II genes in soybean epidemic asthma patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1997**, *156*, 1394–1398. [CrossRef] [PubMed]
6. Rodrigo, M.J.; Morell, F.; Helm, R.M.; Swanson, M.; Greife, A.; Antó, J.M.; Sunyer, J.; Reed, C.E. Identification and partial characterization of soybean-dust allergens involved in the Barcelona asthma epidemic. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1990**, *85*, 778–784. [CrossRef]
7. Gonzalez, R.; Polo, F.; Zapatero, L.; Caravaca, F.; Carreira, J. Purification and characterization of major inhalant allergens from soybean hulls. *Clin. Exp. Allergy* **1992**, *22*, 748–755. [CrossRef] [PubMed]
8. Gonzalez, R.; Varela, J.; Carreira, J.; Polo, F. Soybean hydrophobic protein and soybean hull allergy. *Lancet* **1995**, *346*, 48–49. [CrossRef]
9. Morell, F.; Codina, R.; Rodrigo, M.J.; Sunyer, J.; Antó, J.M.; Reed, C.E. Diagnosis of soybean-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1995**, *96*, 320–324. [CrossRef]
10. Gonzalez, R.; Duffort, O.; Calabozo, B.; Barber, D.; Carreira, J.; Polo, F. Monoclonal antibody-based method to quantify Gly m 1. Its application to assess environmental exposure to soybean dust. *Allergy* **2000**, *55*, 59–64. [CrossRef] [PubMed]

11. Pinto, R.J.C.; Croce, J.; Kalil, J.; Cardoso, M.R. Poeria de soja inalada e alergia respiratória no Brasil. *Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.* **2007**, *30*, 198–203.
12. Gijzen, M.; Gonzalez, R.; Barber, D.; Polo, F. Levels of airborne Gly m 1 in regions of soybean cultivation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *112*, 803–805. [CrossRef]
13. Antonicelli, L.; Ruello, M.L.; Monsalve, R.I.; Gonzalez, R.; Fava, G.; Bonifazi, F. Assesment of airborne soy-hull allergen (Gly m 1) in the Port of Ancona, Italy. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *42*, 278–285.
14. Aceves, M.; Grimalt, J.O.; Sunyer, J.; Antó, J.M.; Reed, C.E. Identification of soybean dust as an epidemic asthma agent in urban areas by molecular marker and RAST analysis of aerosols. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1991**, *88*, 124–134. [CrossRef]
15. Codina, R.; Arduoso, L.; Lockey, R.F.; Crisci, C.; Bertoya, N. Sensitization to soybean hull allergens in subjects exposed to different levels of soybean dust inhalation in Argentina. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2000**, *105*, 570–576. [CrossRef] [PubMed]
16. Codina, R.; Oehling, A.G., Jr.; Lockey, R.F. Neoallergens in Heated Soybean Hull. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1998**, *117*, 120–125. [CrossRef] [PubMed]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ID	Status	Actions	Title	Create Date	Submit Date	Funding	Keyword
14291	Submitted for Review	    	The advance in Poaceae pollen seasonality pattern may impact allergy treatment practice	8/27/2020	8/27/2020	University	401. Aerobiology

The advance in Poaceae pollen seasonality pattern may impact allergy treatment practice

J. F. Camargo^a, S. Brill^b, C. C. T. de Souza^c, B. Sebben^a, T. Pauliquevis^d, P. E. Taylor^e, N. Rosário^c, R. H. M. Godoi^{a*}

^a Environmental Engineering Department, Federal University of Paraná, Paraná, Brazil

^b Multiphase Chemistry Department, Max Planck Institute for Chemistry, 55128 Mainz, Germany

^c Department of Pediatrics, Federal University of Paraná, Curitiba 80060-240, Brazil

^d Department of Environmental Sciences, Federal University of São Paulo, Diadema, Brazil

^e Department of Pharmacy and Biomedical Sciences, La Trobe University, Bundoora, Australia

A) Rationale

Climate is known to have a significant effect on pollination periods of several plants in the northern hemisphere, e.g. Poaceae, which is the main cause of pollen allergy worldwide. This study analyzed whether the seasonal pattern of airborne Poaceae pollen has changed in Curitiba, Southern Brazil.

B) Methods:

For bioaerosol sampling, a Hirst-Burkard-7-day volumetric spore trap was used. The pollens were stained and identified via light microscopy. Pollen counts were obtained for 222 days in 2018 and compared with those of a previous study performed with the Durham palinometer during 1981/82.

C) Results:

The Poaceae season started in August and went on to April ($\bar{x} = 5.3 \text{ m}^{-3}$), corresponding to 90% of all counted Poaceae pollen. The highest daily concentration of Poaceae pollen occurred in September 2018 with a maximum of 27 m^{-3} , and the lowest counts were observed between May to July ($\bar{x} = 1.1 \text{ m}^{-3}$). However, the Poaceae season started in September in the year 1981, peaking in the middle of November, two months later than in 2018.

D) Conclusions:

There is strong evidence for a change in the annual cycle of airborne pollen in Curitiba when comparing Poaceae in 2018 to 1981/82, as the pollination period started and peaked earlier. However, the end of the Poaceae season in April seems to remain consistent. This shift may have been triggered by annual climatic variations, climate change, and/or urbanization, leading to seasonal and perennial symptoms in patients allergic to grass pollen.